

MÁRIO CÉSAR JUCOSKI BIER

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA ATRAVÉS DA
BIOTRANSFORMAÇÃO DO LIMONENO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUO NATURAL DE LARANJA COMO SUBSTRATO**

CURITIBA
2011

MÁRIO CÉSAR JUCOSKI BIER

**PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE AROMA ATRAVÉS DA
BIOTRANSFORMAÇÃO DO LIMONENO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUO NATURAL DE LARANJA COMO SUBSTRATO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Processos Biotecnológicos, do Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriane B. P. Medeiros

CURITIBA
2011

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de realizar meu trabalho e poder concluir mais uma meta.

A minha orientadora Professora Dr. Adriane Bianchi Medeiros pela oportunidade e pela orientação para concretizar mais uma formação acadêmica, além da força e apoio dados durante este trabalho.

Ao professor Dr. Juarez Oliveira pelos valiosos conhecimentos, pelo apoio, confiança e colaboração. Ao professor Dr. Júlio César de Carvalho, pelos conselhos e auxílios.

Ao corpo docente do programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da UFPR, e um agradecimento especial à querida Mitiyo, por todo conhecimento, carinho e por todo o seu trabalho investido nesse laboratório.

À cooperação do LACAUT_{ETS}, especialmente à Lilian Côcco, ao professor Yamamoto e também à Mitsuka Matsui.

À Coordenação do programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da UFPR, professora Dra . Luciana Vanderberghe e Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela oportunidade, acolhida e presteza.

Aos demais professores do programa: Prof^a. Dr^a Adenise L. Woiciechowski, Prof^a. Dr^a Michele Rigon Spier, Prof^o. Me. Luiz Alberto Junior Letti, e Prof^a. Dr^a Vanete T. Soccol, pelo estímulo, apoio, e por compartilhar seus conhecimentos.

Aos alunos de iniciação científica Vanessa Furioso e Sabrina Poletto pelo trabalho prestado, por todo seu esforço, paciência e colaboração.

Aos amigos e colegas do LPB-I e LPB-II: Ju Oliveira, Sidnei Bordignon, Cristine Rodrigues, Valesca Weingartner, Suzan C. Rossi, Denise Salmon, Marcelo Maceno, Alessandra Novak, André Melo, André da Silva, Gustavo Halfen, Carol Tiemi, Vanessa Ghighi, Eduardo Sidney, Ryu Masaki, Michelle Tanoue, Leandro Freire, Francisco M. Vitola, Franciele Goelzer, Ricardo Cancio, Daniel, Carlos Sanchuki, Jefferson Costa, Gisele Matos, Diva, Felipe Briski, Jayme Azevedo, Luiz Gustavo, Alfredo Walter e Mara E. Matos.

A meu pai, a minha mãe, minha irmã e também a Luna, Hanna e Huguinha que sempre me apoiaram em minhas decisões e me alegraram nas dificuldades.

Aos meus amigos Adrian, Leonardo, Thiago, Tiago, Luiz Fernando, Vlailson, César e minhas amigas Vanessa, Melissa, Izabel e Cassiana.

E aos amigos e colegas que aqui não citei por serem tantos que trabalharam e que conviveram, e os que ainda convivem comigo nos Laboratórios LPB I e LPB II, e ao pessoal da coordenação e da pós-graduação.

RESUMO

Aromas e fragrâncias incorporadas em alimentos, perfumes e cosméticos possuem alto valor comercial, possibilitando um grande potencial econômico para obtenção de uma ampla variedade de biomoléculas de interesse nestas áreas. A produção industrial de aromas corresponde a 25% do mercado mundial de aditivos alimentares. Entre os métodos para produção de aromas, a biotransformação de terpenos representa uma alternativa muito atrativa. Esta é uma via biotecnológica que apresenta vários benefícios em relação aos métodos químicos, como aproveitamento de resíduos e geração de compostos naturais. Atualmente, a busca por fontes alternativas de aromas e fragrâncias fortalece a via biotecnológica. Terpenos como limoneno, α -pineno e β -pineno representam uma interessante fonte para biotransformação, pois são abundantes em resíduos agroindustriais e florestais e podem ser biotransformados em interessantes compostos de aroma. O objetivo deste estudo foi desenvolver um processo biotecnológico completo que envolvesse o isolamento e seleção de cepas com potencial para biotransformar substratos terpênicos, caracterização de resíduos e seleção para fermentação em estado sólido, *screening* dos produtos de biotransformação, fermentação em estado sólido e otimização do processo. Quatro resíduos distintos foram utilizados, dentre eles, o resíduo de laranja (casca e bagaço) se destacou quanto a sua concentração de limoneno (0,055g/g de substrato seco) e alta quantidade de açúcares redutores (10,13%) e totais (21,13%) e foi utilizada posteriormente para a fermentação no estado sólido (FES). Foram testados micro-organismos obtidos de coleções e isolados de uma fonte natural de terpenos. Vinte e uma cepas foram selecionadas por sua resistência a terpenos em Ágar Batata Dextrose contendo 1% de limoneno ou α -pineno e β -pineno (1:1). Posteriormente, dez cepas foram selecionadas por sua capacidade de utilizar estes terpenos como fonte de carbono em meio mineral contendo 1% de limoneno ou α -pineno e β -pineno (1:1). A capacidade de biotransformação em meio líquido foi testada para dez cepas e quatro delas produziram compostos de interesse na indústria de alimentos como carvona (245,10 μ L/L), limoneno-1,2-diol (73,80 μ L/L) e álcool perílico, sendo a mais produtiva das cepas o fungo isolado 3a. O cultivo desta cepa foi otimizada quanto aos tipos de preparo do inóculo, escolhendo-se um inóculo em forma de pellets fúngicos crescidos em extrato aquoso do resíduo da laranja. Como resultado da fermentação no estado sólido, utilizando resíduo de laranja, foram obtidos como produtos principais limoneno-1,2-diol (3320,46 μ g/g de substrato) e α -terpineol (411,48 μ g/g), após a otimização do processo estudando as variáveis pH, taxa de inóculo e granulometria. Todos os experimentos ocorreram a 30°C e por um período de 7 dias. As fermentações submersas ocorreram sob agitação de 120 rpm. Estes resultados confirmam a capacidade da biotransformação do limoneno por fermentação no estado sólido, um processo inexistente na literatura até o momento no estado sólido, e escasso quando se aplicam resíduos.

Palavras-chave: Limoneno, biotransformação, resíduo de laranja, aroma, Limoneno-1,2-diol.

ABSTRACT

Aromas and fragrances incorporated into foods, perfumes and cosmetics have high commercial value providing great economical potential in the obtention of a wide variety of biomolecules. The industrial production of aromas corresponds to 25% of the world market of food additives. Among the methods for production of flavorings, the biotransformation of terpenes represents a very attractive alternative. This biotechnological via has several benefits over corresponding chemical methods, such as recovery of waste and generation of natural compounds. Currently, the search for alternative sources of flavors and fragrances strengthens of biotechnological processes. Terpenes like limonene, α -pinene and β -pinene represent an interesting source for biotransformation - are abundant in agro-industrial residues and forest wastes and can be biotransformed in interesting flavor compounds. The objective of this study was to develop a complete biotechnology process that involves the isolation and selection of strains with potential to biotransform terpene substrates, selection and characterization of residues as substrate for solid-state fermentation, screening of biotransformation products, fermentation in solid-state process (FES) and optimization. Four distinct residues were characterized, among them, the orange residue (peel and bagasse) stood out as the concentration of limonene (0.055 g / g dry substrate) and amount of reducing sugars (10.13%) and total sugars (21.13%) was very high and was used later for FES. Micro-organisms obtained from collections and isolated from a natural source of terpenes were tested. Twenty one strains were selected for their resistance to terpenes in potato dextrose agar containing 1% limonene or α and β -pinene (1:1). Later, ten strains were selected for their ability to use these terpenes as a carbon source in mineral liquid medium containing 1% of limonene or α -pinene and β -pinene (1:1) and therefore was selected to serve as a substrate for biotransformation. The biotransformation capacity in liquid media was tested for ten strains and four of them produced compounds of interest in the food industry as carvone (245.10 μ L/L), limonene-1,2-diol (73.80 μ L/L) and perillyl alcohol, being the most productive strain was the isolating fungi 3a. The culture of this strain was optimized on the inoculum type resulting in a inoculum of fungi pellets grown in aqueous extract of orange residue. As result of the solid-state fermentation were obtained as main products limonene-1,2-diol (3320.46 μ g/g substrate) and α -terpineol (411.48 μ g/g substrate), obtained after optimization studying the process variables pH, inoculum rate and particle size. All experiments occurred at 30°C over a period of 7 days. The submerged fermentation occurred under agitation of 120 rpm. These results confirm de capacity to perform limonene biotransformation by solid state fermentation, a process that does not exist in the literature so far in solid state, and is little report residue when residues are applied.

Keywords: Limonene, biotransformation, orange residue, aroma, Limoneno-1,2-diol.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO GERAL.....	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 AROMAS.....	4
2.2 BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE AROMAS.....	5
2.2.1 Produção de aromas por micro-organismos.....	9
2.2.2 Produção de aromas por enzimas.....	10
2.2.3 Produção de aromas por vegetais.....	11
2.3 TERPENOS.....	11
2.3.1 Limoneno.....	13
2.3.2 Álcool Perílico.....	14
2.3.3 Carvona.....	15
2.3.4 α -terpineol.....	16
2.3.5 Limoneno-1,2-diol.....	17
2.3.6 α -pineno e β -pineno.....	18
2.3.7 Outros terpenóides.....	18
2.5 FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	19
2.6 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.....	19
2.6.1 Fatores físicos e químicos.....	21
2.6.1.1 Temperatura.....	21
2.6.1.2 pH.....	22
2.6.1.3 Osmolaridade.....	23
2.6.1.4 Atividade de água.....	23
2.6.1.5 Relação Carbono:Nitrogênio (C:N).....	24
2.7 SUBSTRATOS.....	25
2.7.1 Resíduo de laranja.....	25
2.7.2 Bagaço de maçã.....	26
2.7.3 <i>Pinus</i> : Casca, cepilho e acícula de <i>Pinus</i>	27
2.8 ESTATÍSTICA.....	29
2.8.1 Diagrama de Pareto.....	29
2.8.2 Tabela de ANOVA.....	29
2.8.3 Coeficiente de correlação e de determinação.....	30
3.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 SUBSTRATOS.....	31
3.1.1 Resíduo de laranja.....	31
3.1.2 Bagaço de maçã.....	31
3.1.3 Casca e acícula de <i>Pinus</i>	32
3.1.4 Cepilho de <i>Pinus</i>	32
3.2 PREPARO DOS SUBSTRATOS.....	33
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS.....	33
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DOS SUBSTRATOS.....	33
3.4.1 Extrações com GLP.....	34

3.4.2 Extrações com hexano.....	36
3.4.3 Extrações com diclorometano e n-pentano.....	35
3.5 MICRO-ORGANISMOS.....	36
3.5.1 Isolamento dos micro-organismos.....	37
3.5.2 Preparo do inóculo.....	37
3.5.3 Manutenção das cepas.....	39
3.6 SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS.....	39
3.7 TESTE DE FONTE DE CARBONO.....	39
3.8 BIOTRANSFORMAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO SINTÉTICO.....	40
3.9 BIOTRANSFORMAÇÃO EM MEIO SÓLIDO.....	40
3.10 ESTUDO DO TIPO DE INÓCULO.....	41
3.10.1 Primeiro teste de inóculo.....	41
3.10.2 Segundo teste de inóculo.....	41
3.11 OTIMIZAÇÃO DA BIOSTRANSFORMAÇÃO EM MEIO SÓLIDO..	42
3.12 ANÁLISES DO FERMENTADO EM ESTADO SÓLIDO.....	44
3.12.1 Umidade e pH.....	44
3.12.2 Açúcares.....	44
3.11.3 Análise dos compostos voláteis.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO.....	48
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO SUBSTRATO.....	48
4.2.1 Comparação entre os métodos de extração de terpenos..	51
4.3 GC-MS DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO SUBSTRATO.....	53
4.4 ISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS.....	56
4.5 SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS.....	56
4.6 TESTE DE FONTE DE CARBONO.....	62
4.7 FERMENTAÇÃO SUBMERSA – SCREENING.....	63
4.8 TESTE DE INÓCULO.....	68
4.8.1 Primeiro teste do inóculo.....	68
4.8.2 Segundo teste do inóculo.....	69
4.9 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	71
4.9.1 Teste de substrato.....	71
4.9.2 Utilização de resíduo da laranja para fermentação no estado sólido.....	72
4.9.3 Planejamento experimental.....	72
4.9.3.1 Produtos formados.....	74
4.9.3.2 Análise estatística.....	76
4.10 CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	80
4.10.1 Produção de Limoneno-1,2-diol.....	80
4.10.2 Consumo de limoneno.....	81
4.10.3 pH.....	82
4.10.4 Umidade.....	83
4.10.5 Açúcar-redutor.....	84
5 CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXOS.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção biotecnológica de compostos de aroma em diferentes trabalhos por métodos diversos.....	6
Tabela 2: Relação de diferentes micro-organismos na produção de aromas.....	9
Tabela 3: Relação de trabalhos envolvendo biotransformação de terpenos por diferentes organismos.....	12
Tabela 4: Biotransformação para produção de álcool perílico e ácido perílico.....	15
Tabela 5: Biotransformação para produção de carvona.....	16
Tabela 6: Trabalhos relatando a biotransformação para produção do α -terpineol.....	17
Tabela 7: Trabalhos relatando a biotransformação para produção do Limoneno-1,2-diol.....	17
Tabela 8: Comparação entre FES e Fermentação Submersa.....	20
Tabela 9: Temperaturas utilizadas na biotransformação do limoneno.....	22
Tabela 10: pH utilizado na biotransformação do limoneno.....	23
Tabela 11: Métodos utilizados para caracterização físico-química dos substratos.....	33
Tabela 12: Códigos utilizados para os micro-organismos disponíveis no banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB).....	37
Tabela 13: Composição do meio mineral (BICAS; PASTORE, 2007).....	40
Tabela 14: Primeiro planejamento fatorial com três repetições no ponto central para as variáveis pH, umidade, taxa de inóculo e granulometria.....	44
Tabela 15: Segundo planejamento fatorial com três repetições no ponto central para as variáveis pH, taxa de inóculo e granulometria.....	44
Tabela 16: Composição físico-química do bagaço de maçã, resíduos de laranja e cepilho de <i>Pinus</i>	48
Tabela 17: Porcentagem de extrato obtido da acícula de <i>Pinus</i> por diferentes métodos de extração testados.....	49
Tabela 18: Concentração em porcentagem de limonene, β -pineno e α -pineno no extrato.....	49
Tabela 19: Análise qualitativa em GC-MS da composição dos diferentes substratos em estudo, sob os diferentes métodos de extração.....	54
Tabela 20: Análise qualitativa em GC-MS da composição dos diferentes substratos em estudo, sob os diferentes métodos de extração.....	57
Tabela 21: Seleção dos fungos quanto a capacidade de crescer em meio contendo 1 % de terpenos.....	59
Tabela 22: Seleção de micro-organismos isolados em relação ao crescimento...	59
Tabela 23: Seleção de cepas do laboratório em relação ao crescimento... ..	58
Tabela 24: Compostos identificados por GC-MS no meio fermentando das cepas selecionadas. Lin significa limoneno e β -pin significa β -pineno.....	64
Tabela 25: Produtos da detectados na fermentação submersa após extração.....	66
Tabela 26: Principais terpenóides identificados por GC-MS em fermentação em	

estado sólido do resíduo da laranja com a cepa isolada 3a.....	73
Tabela 27: Concentrações obtidas dos produtos da biotransformação do limoneno nos diferentes ensaios.....	75
Tabela 28: Tabela de ANOVA do consumo de limoneno.....	79
Tabela 29: Tabela de ANOVA da produção de α -terpineol.....	79
Tabela 30 – Concentração de Limoneno-diol durante os diferentes dias de fermentação.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais rotas envolvidas na biotransformação do limoneno (Fonte: MARÓSTICA JUNIOR; PASTORE, 2007b).....	14
Figura 2: Fluxograma geral das etapas realizadas no presente estudo.....	31
Figura 3: Modelo descritivo do extrator utilizado na extração com GLP. Fonte: Cunico <i>et al.</i> , 2003.....	35
Figura 4: Inóculo em forma de pellets crescido em extrato aquoso do resíduo da laranja.....	43
Figura 5: Crescimento da altura do micélio de <i>Rhizopus</i> na presença do limoneno a 1% em comparação com o meio controle após 7 dias de cultivo (%).....	61
Figura 6: Crescimento da altura do micélio de <i>Rhizopus</i> na presença de 1% de α e β -pineno em comparação com o meio controle após 7 dias de cultivo (%).....	61
Figura 7: Concentração de biomassa obtida usando limoneno como fonte de carbono (1% v/v).	63
Figura 8: Concentração de biomassa obtida usando α - e β -pineno como fonte de carbono (1% v/v).....	63
Figura 9: Concentração de limoneno ao longo do processo fermentativo das leveduras <i>P. stipitis</i> e Y4b em meio mineral contendo inicialmente 1% de limoneno.....	65
Figura 10: Cinética de açúcares para o teste de seleção do inóculo.....	69
Figura 11: Aspecto do fungo isolado 3a após 7 dias de cultivo em PDA.....	70
Figura 12: Cultivo do fungo isolado 3a em resíduo de laranja.....	71
Figura 13: Ensaios do planejamento experimental demonstrando as concentrações finais de limoneno após 7 dias de fermentação.....	76
Figura 14: Diagrama de Pareto – Consumo de limoneno ao final da fermentação.....	77
Figura 15: Diagrama de Pareto – Concentração final de α -terpineol após 7 dias de fermentação.....	78
Figura 16: Variação da concentração de limoneno-diol produzido durante o processo fermentativo.....	80
Figura 17: Variação da concentração de limoneno consumido durante o processo fermentativo.....	81
Figura 18: Variação do pH durante o processo fermentativo.....	83
Figura 19: Variação da umidade durante o processo fermentativo.....	83
Figura 20: Variação da concentração de açúcares-redutores durante o processo fermentativo.....	84

1 INTRODUÇÃO

Centenas de diferentes substâncias são fabricadas com a ajuda de micro-organismos. Várias espécies de leveduras, fungos, bactérias e actinomicetos são utilizados em processos de fabricação. Entre estas substâncias fabricadas por micro-organismos encontram-se os aromas.

Desde o começo dos tempos, aromas e *flavors* pregam importante papel na vida do homem. Até o século 20, muitos *flavors* naturais eram obtidos de animais e plantas superiores. Porém as fontes destes materiais reduziram-se devido a aspectos sociais, econômicos, políticos, conservacionistas, de proteção da vida selvagem e de crescimento industrial.

Os fungos são organismos responsáveis pela fabricação de diversos produtos de grande importância, como a fabricação de alimentos, bebidas, ácidos orgânicos, fármacos, e inúmeros outros produtos. Apesar da grande quantidade de espécies de fungos já descritas, há um potencial muito maior a ser alcançado entre diversas espécies ainda não descobertas ou exploradas. Sabemos que em nosso país há uma enorme diversidade e o potencial que existe em explorar micro-organismos ainda desconhecidos é surpreendente. Muitos trabalhos acabam por ignorar esta rica biodiversidade, limitando-se a utilizar micro-organismos já descritos em processos determinados.

O consumo de alimentos e bebidas está com certeza ligado às sensações sentidas pelo homem. A sensação que chamamos de odor ou cheiro é resultado de uma mistura complexa de inúmeras moléculas que ocorrem em concentrações diferentes e juntas formam o que chamamos de aromas, no caso de alimentos e fragrância, no caso de perfumes.

O aumento na utilização de aromatizantes faz com que as empresas busquem fontes alternativas. As rotas convencionais de síntese química e o isolamento de plantas continuam sendo viáveis, mas a produção biotecnológica se apresenta como uma nova opção, pois permite a obtenção de aromas naturais. Além disto, a Biotecnologia oferece vantagens em relação à extração tradicional de matéria vegetal, com diversas vantagens como a especificidade dos produtos finais, garantia de suprimento independente da época do ano e a possibilidade de

utilização de matérias-primas alternativas, como resíduos agroindustriais, o que contribuem para o barateamento da matéria-prima. A produção de aromas pode ocorrer por biossíntese ou biotransformação. A biotransformação ou bioconversão nada mais é que a modificação de um composto específico para um de seus derivados através da utilização de um sistema biológico ou enzima. Dentre as vantagens deste método encontram-se o baixo custo e a utilização de condições suaves no processo.

A utilização adequada dos resíduos para finalidades como a produção de aromas ajuda a minimizar problemas ambientais e energéticos. O processamento de produtos agroindustriais gera grandes quantidades de resíduos, cujo acúmulo tem constituído um grave problema de poluição ambiental. No que se refere a biotransformação do limoneno, a literatura é bastante escassa quanto ao uso de resíduos e no que remete a obtenção de derivados do limoneno por fermentação no estado sólido, é inexistente.

Terpenos são baratos, facilmente disponíveis e precursores naturais renováveis. Eles constituem um grande grupo de compostos naturais com mais de 22.000 estruturas conhecidas. Os monoterpenos, os quais são amplamente distribuídos na natureza, constituem excelentes substratos, os quais são excelentes precursores para processos biotecnológicos. Muitos trabalhos utilizando terpenos e seus derivados já foram publicados.

Desenvolver um processo biotecnológico envolve desde o isolamento dos micro-organismos, escolha do substrato, seleção dos micro-organismos, seleção de produtos, preparo do meio fermentativo, produção dos compostos de interesse, análise e identificação, otimização do processo, recuperação e purificação. Buscou-se explorar os micro-organismos naturais de nossa própria biodiversidade e atribuir valor ao resíduo utilizado, reduzindo a poluição e minimizando os custos do processo.

1.1 OBJETIVO GERAL

Esta dissertação apresenta-se na finalidade de enriquecer as alternativas

acerca da produção de aromas pelas vias biotecnológicas, usando micro-organismos capazes de oxidar terpenos a partir de resíduos. O objetivo geral é a obtenção de compostos de interesse para a indústria de aromas a partir da fermentação em estado sólido de um resíduo agroindustrial ou florestal, realizando todas as etapas de um processo biotecnológico anteriores a obtenção do produto, não abrangendo as etapas de purificação e recuperação do produto.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Isolar e selecionar micro-organismos capazes de biotransformar terpenos;
- ❖ Testar e selecionar micro-organismos já disponíveis no laboratório de processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná quanto a sua capacidade de biotransformar terpenos;
- ❖ Realizar a biotransformação dos terpenos em meio líquido;
- ❖ Selecionar e caracterizar resíduos agroindustriais ricos em terpenos;
- ❖ Utilizar a fermentação no estado sólido e otimizar o processo;
- ❖ Identificar e quantificar os compostos formados;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AROMAS

Na definição contida na resolução de número 104, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1999) aromas, ou aromatizantes, são substâncias ou misturas de substâncias com propriedade odorífera e/ou sávida (com sabor), capazes de conferir ou intensificar sabor aos alimentos. Excluem-se da definição os produtos que conferem exclusivamente sabor doce, salgado, amargo, azedo ou umami bem como, as substâncias alimentícias, ou produtos normalmente consumidos como tal, com ou sem reconstituição. Com base na sua origem, classificam-se os aromas como naturais e sintéticos, mas há ainda outros tipos especiais, como os de reação ou transformação e os de fumaça.

Aromas naturais são obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas naturais. Entenda-se por isso os produtos de origem animal ou vegetal normalmente utilizados na alimentação humana, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado, como torrefação e fermentação, entre outros. Os aromas naturais são subdivididos em: óleos essenciais; extratos; bálsamos; oleorresinas; oleogomarresinas e isolados (PEREIRA, 2007). As legislações norte-americana e européia referem-se aos compostos de aroma naturais àqueles obtidos por processos físicos (extração de suas fontes naturais) ou por processos enzimáticos e microbianos que envolvem precursores isolados na natureza, sendo que o composto obtido deve ser idêntico ao já existente na natureza para que a substância seja legalmente rotulada como natural (SERRA; FUGANTI; BRENNAN, 2005).

Dentro da boca os alimentos são apenas doces, salgados, azedos, amargos ou umami. Isto ocorre porque os compostos responsáveis pelo sabor não são voláteis às temperaturas ambiente e somente se interrelacionam com as papilas gustativas. Quando um alimento é consumido, a interação das sensações de gosto, odor e textura produzem uma impressão global que é melhor definida

pela palavra inglesa *flavor*. Os aromas podem ser considerados como os constituintes voláteis do flavor (SOARES, 1998).

Aromas e fragrâncias incorporadas dentro de alimentos, perfumes e produtos cosméticos possuem alto valor no mercado mundial, e o interesse econômico relativo a componentes de aromas direciona a atenção para a seleção de espécies comercialmente cultivadas na quantidade e qualidade das substâncias voláteis (SANTOS, SERAFINI; CASSEL, 2003).

Compostos de aroma podem apresentar não apenas características sensoriais, mas outras características desejáveis como atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral; Atividade antioxidante; Redução de gordura; Regulação da pressão arterial; Propriedades anti-inflamatórias (BERGER, 2009).

2.2 BIOTECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE AROMAS

Na literatura, muitos processos microbianos foram descritos como capazes de produzir compostos interessantes. Muitas fermentações em estado sólido de biossíntese ou bioconversão foram descritos, mas com poucas aplicações. A maioria envolve fungos e cogumelos comestíveis. Lactonas, metil-cetonas, vanilina, benzaldeído, alcoóis, ésteres e outros compostos podem ser produzidos por vários fungos (FERON; BONNARME; DURAND, 1996).

A exploração da via biotecnológica para a produção de aromas naturais provou-se viável e de interesse econômico. A bioprodução de γ -decalactona é um bom exemplo. O preço decaiu de US\$ 20.000/kg do começo da década de 80 para 1200/kg em 1995, devido a adesão a produção biotecnológica. Estima-se que 100 compostos de aroma possam ser produzidos por micro-organismos (DELEST, 1995).

Deste compostos que possam ser produzidos biotecnologicamente, poucos são produzidos em escala industrial. Isto ocorre devido aos altos custos dos processos em uso, o que significa que as aplicações focam principalmente produtos de alto valor como as lactonas (de US\$ 6.000/Kg a US\$ 1.200/Kg), extratos de baunilha (US\$ de 1.200/Kg a 4.000/Kg) e ésteres variados. Até mesmo

para estes compostos, a falta de conhecimento de suas vias biossintéticas é um dos maiores obstáculos para a produção industrial (FERON; BONNARME; DURAND, 1996).

A maior parte dos compostos de aroma é produzida pela síntese química ou extraídos de matéria natural. Entretanto, pesquisas recentes do mercado demonstram que os consumidores preferem produtos alimentícios que possam ser considerados “naturais” (ROSSI *et al.*, 2009). A produção industrial de aromas corresponde a 25% do mercado mundial de aditivos (COUTO; SANROMÁN, 2006).

O resultado produção de compostos voláteis por micro-organismos têm muitas vantagens com relação aos métodos químicos. Produtos obtidos por processos biotecnológicos são preferenciais porque, além de serem considerados naturais ou idênticos aos naturais são estéreo-quimicamente puros e muito mais fáceis de serem biodegradados. Este contraste é grande quando comparamos com os métodos tradicionais, processo de síntese química, os quais se obtém produtos racêmicos e que não são facilmente biodegradáveis (MEDEIROS, 2006).

Alguns fungos em particular possuem uma incrível diversidade metabólica, o que e termos de “síntese de novo” e bioconversão, dá acesso e produção de importantes compostos voláteis (FERON; BONNARME; DURAND, 1996). A tabela 1 lista a produção de aromas em diferentes trabalhos.

Tabela 1: Produção biotecnológica de compostos de aroma em diferentes trabalhos por métodos diversos.

Composto	Aroma (impacto)	Método de Produção	Micro-organismo	Enzima	Referências
2-feniletanol	Frutal/rosas	Biossíntese	<i>S. cerevisiae</i> <i>K. marxianus</i> <i>A. niger</i>		Janssen (1991) Atika (1990)
Cetona de framboesa	Framboesa	Conversão enzimática	<i>A. niger</i>	B-glicosidase	Hugency (1995)
Ésteres e terpenos	Frutas/Flores	Biossíntese	<i>C. boidinii</i> <i>Ceratocystis sp</i>		Pandey (2000)
6-pentil- α -pirona	Coco	Biossíntese	<i>T.harzianum</i>		Hausler e Munch (1997)
Citronelol, geraniol e linalol	Frutal/floral-terpenos	Biossíntese	<i>K. lactis</i>		Pastore et al, (2003)

Γ-decalactona	Pêssego	Biossíntese	<i>S. odor</i>		Takahara (1972)
Vanilina	Baunilha	Bioconversão	<i>E.coli</i> (<i>Amycolatopsis</i> sp) <i>Artrobacter</i> , <i>Corynebacterium</i> ou <i>Pseudomonas</i> strains <i>Penicillium roquefortii</i>	Lipase comercial	Yoon (2005) Van Den Brent (1999) Tomasini <i>et al</i> (1995)
2-heptanonas Metil cetonas Ácidos graxos Ácido octanóico Metil -7, ácido isojasmonico	Queijo azul Floral/jasmin	Conversão enzimática de precursores, FES Conversão enzimática	<i>Bortrydiploidia theobromae</i> <i>Antrodia camphorata</i>	Lipase comercial	Hausler e Munch (1997)
γ-octalactona, γ - undecalactona, γ - dodecalactona γ-lactona L -linalol	Pêssego Cítrico	Fermentação submersa			Lu (2011)
1-octen-3-ol, 2-octen-1-ol, 3-octanol, 1-octanol, 3-octanona	Cogumelos	Fermentação submersa	<i>Antrodia camphorata</i>		Lu (2011)
Carveol, Trans-carveol e Cis-Carvona.	Semente de alcaravia	Biotransformação	<i>Solanum aviculare</i> e <i>Dioscorea deltoidea</i> (células vegetais)		Vanek, Valterova e Valsar (1998)
Trans-pinocarveol	-----	Biotransformação do β-pineno	<i>Picea abies</i> (células vegetais)		Lindmark-Henriksson, (2003)

Fonte: Adaptado de Rossi (2011)

A biotransformação ou bioconversão pode ser definida como o uso de sistemas para produzir mudanças químicas em compostos que não são seus substratos originais. Sistemas isolados de enzimas ou micro-organismos inteiros podem ser utilizados para biotransformação. Cada um tem suas vantagens e desvantagens. Muitos sistemas isolados de enzimas estão comercialmente disponíveis ou são relativamente fáceis de isolar e podem ser estáveis e fáceis de utilizar, muitas vezes gerando produtos simples. Porém, algumas reações em que

co-fatores são utilizados, a necessidade de regenerar o co-fator pode ser tornar uma complicação. Organismos completos não possuem esta desvantagem e geralmente apresentam custos mais baixos em sua utilização se comparados a sistemas de enzimas, porém, possuem uma tendência a gerar mais de um único produto (HANSON, 1995).

O uso de biotransformação de compostos orgânicos, empregando fungos, bactérias e leveduras, além de despertar o interesse acadêmico, é clássico em alguns problemas industriais, nas áreas químico-farmacêuticas (STRAPASSON, 1996). Biotransformações têm uma série de vantagens quando comparadas aos métodos químicos correspondentes. As condições de tais processos são suaves e na maioria dos casos não necessitam de proteção de outros grupos funcionais. Economicamente, biotransformações podem ser mais baratas e mais diretas do que seus análogos da química e as conversões procederão normalmente, em condições que são consideradas ecologicamente aceitáveis. (ALEU; COLLADO, 2001).

A vantagem do uso de sistemas biológicos (micro-organismos ou enzimas isoladas) é que as reações são realizadas em condições suaves, o que é útil para compostos sensíveis a condições drásticas. Além disto, com esse método é possível funcionalizar posições em cadeias carbônicas difíceis de serem alcançadas através de técnicas tradicionais. Outra grande vantagem de se utilizar a biotransformação de compostos orgânicos é, em muitos casos, a pureza óptica dos produtos obtidos, enquanto nos métodos sintéticos convencionais a obtenção de isômeros ópticos puros é relativamente mais difícil.

O primeiro passo para a biotransformação é a seleção de micro-organismos resistentes que possam utilizar o substrato como fonte de carbono. Isto indica a existência de rotas metabólicas que degradem este substrato, levando ao acúmulo de interessantes produtos intermediários (BICAS; DIONÍSIO; PASTORE, 2009). Além disso, os rendimentos do método da biotransformação são bastante elevados e este processo gera menos subprodutos que os métodos químicos.

Os compostos de aroma estão freqüentemente presentes em baixas concentrações nos sistemas fermentativos, resultando em alto custo para os

processos de recuperação, mas isso pode ser compensado pelo alto preço dos aromas naturais, de 10 a 100 vezes maiores que os sintéticos (MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007a).

Estudos descrevendo a biotransformação de terpenos usando enzimas, extratos celulares e células de bactérias, cianobactérias, leveduras, microalgas, fungos filamentosos e plantas estão relatados. Isolamento e purificação de enzimas podem ser difíceis e caros. Biocatálises utilizando células inteiras são mais baratas e fáceis de obter que enzimas isoladas, mas podem adicionar contaminantes ao produto final. Com células inteiras, membranas e paredes protegem as enzimas enquanto co-fatores podem ser regenerados sob certas condições. Cascata de reações como as necessárias para a produção de esteróides pode ser realizada por uma única célula biocatalisadora. Porém, controle e reprodutibilidade de bioconversões com células inteiras são mais difíceis de alcançar do que com processos enzimáticos e reações paralelas costumam ocorrer (CARVALHO; FONSECA, 2006).

2.2.1 Produção de aromas por micro-organismos

Muitos micro-organismos são capazes de sintetizar compostos de aroma quando cultivados em meios de cultura adequados, demonstrando sua habilidade de conversão, as quais em outro sistema poderiam necessitar de diversas etapas químicas (KEMPLER, 1983). Diversos micro-organismos são capazes de produzir aromas específicos, assim como compostos voláteis com aromas característicos. A maioria dos compostos aromáticos são metabólitos secundários produzidos em baixas concentrações (BRAMORSKI, 1997). Alguns registros da utilização de diferentes micro-organismos apresentam-se a seguir na tabela 2.

Tabela 2: Relação de diferentes micro-organismos na produção de aromas

Publicação	Micro-organismo	Precursor / substrato	Produto
------------	-----------------	--------------------------	---------

Maróstica Júnior e Pastore (2007a).	<i>Penicillium sp.</i>	Limoneno	α -Terpineol
Medeiros <i>et al.</i> , (2000)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Bagaço de mandioca e farelo de palma	Ésteres diversos
Demyttenaere <i>et al.</i> , (2001)	<i>Aspergillus niger</i>	Linalol	Geraniol, nerol, citral e citrol.
Rossi <i>et al.</i> , (2009)	<i>Ceracotystis fimbriata</i>	Polpa cítrica	Etil acetato e isoamil acetato
Soares (1998)	<i>Pachysolen tannophilus</i>	Casca de café	Aroma frutal / banana
Van Dyk <i>et al.</i> , (1998)	<i>Hormonema sp</i>	Mentona e Pulegona	Neomentol

Fungos secretam uma grande variedade de compostos formadores do aroma. Em geral fungos e leveduras responsáveis pelo aroma são predominantemente aeróbicos e utilizam carboidratos e ácidos orgânicos e raramente álcool como sua fonte principal de carbono. Muitos dos estudos sobre produção de aromas por fungos foram realizados em meios como caldo potato dextrose, caldo nutriente, ou caldo extrato de malte. Quando grãos e cereais são utilizados como substrato, a fração volátil de fungos superiores é similar. Butanol, hexanol, octanol e outros álcoois são metabólitos secundários comuns (SCHARPF *et al.*, 1986).

2.2.2 Produção de aromas por enzimas

Apesar dos elevados custos da aplicação de enzimas microbianas na produção de aromas, estas podem oferecer alta seletividade para a conversão de um determinado substrato. Algumas enzimas (lipases, proteases, glicosidases, etc.), catalisam a produção de compostos de aroma através de precursores. Também técnicas como a imobilização de enzimas ou regeneração da coenzima podem ser altamente eficientes e específicas em processos de biocatálise para

síntese de aromas (PANDEY *et al.*, 2008).

2.2.3 Produção de aromas por vegetais

Aromas de plantas são considerados metabólitos finais importantes variando com determinadas fases do metabolismo, independente do clima, localização geográfica, além disso, a recuperação dos compostos é relativamente fácil. Os aromas podem ser obtidos naturalmente das plantas por métodos de extração ou em cultivos celulares usando células vegetais.

O cultivo celular vegetal é comum para diversos processos e bastante aplicado na produção de aromas, tanto na biossíntese (VANEK; VALTERÓVA; VALSAR, 1998) quanto na biotransformação (LINDMARK-HENRIKSSON, 2003). Um caso bastante representativo é a utilização de células vegetais para produção de Vanilina, um aroma muito conhecido (WALTON; MAYER; NARBARD, 2003).

2.3 TERPENOS

Terpenos e seus derivados, os terpenóides, são a classe de substâncias mais diversas na natureza, extensivamente aplicados em indústrias como compostos de aroma e de fragrâncias (SCHRADER; BERGER, 2001). São os principais constituintes responsáveis pelas características odoríferas de óleos essenciais. Como os terpenos são facilmente oxidados e polimerizados, devem ser removidos dos óleos essenciais (KEMPLER, 1983; JANSSENS *et al.*, 1992), pois podem causar “*off-flavors*” indesejáveis e precipitação (SCHRADER; BERGER, 2001).

Os terpenos podem ser visualizados com sendo constituídos de duas ou mais unidades isoprênicas (2-metil-1,3-butadieno), acompanhadas em alguns casos por oxidação, redução, rearranjo, ciclização, ou outras reações químicas. (STRAPASSON, 1997).

Os terpenos incluídos na maioria dos óleos essenciais são metabólitos secundários de origem vegetal, próprios de vários grupos de espécies, definidos pelo aroma e sabor. A volatilidade e insolubilidade em água, e a solubilidade em

solventes orgânicos permite caracterizá-los e promover seu isolamento. Apresentam-se geralmente sob a forma de líquidos oleosos, de aroma agradável e intenso, todavia, existem os de aroma desagradável, e ainda inodoros (COSTA, 1994).

Atualmente com mais de 22 mil compostos individuais, terpenos representam a maior classe de compostos distribuídos na natureza. Eles são produzidos, em parte, como defesa contra micro-organismos e insetos, além de sua capacidade de atrair polinizadores. A biotransformação de terpenos representa uma alternativa muito atrativa para produção de aromas, pois torna-se possível em condições brandas, não gera resíduos tóxicos e permite a produção de aromas naturais que podem ser utilizados como *flavors* e fragrância na indústria. (DIONÍSIO *et al.*, 2009).

Quimicamente os terpenos são hidrocarbonetos insaturados derivados de unidades de isopreno. Possuem baixo custo e são originados em grande escala por serem rejeitos industriais. De acordo com Bicas e Pastore (2007) geralmente a concentração inibitória mínima contra micro-organismos é de menos de 2%, podendo alguns fungos e bactérias suportarem concentrações maiores. Nos experimentos com biotransformação a concentração normal de limoneno costuma variar de 0,2 a 1%.

Transformações de terpenos em geral são afetados pela volatilidade do substrato e toxicidade dos terpenos perante os micro-organismos (ONKEN; BERGER, 1999).

Há diversos trabalhos a respeito da biotransformação de terpenos a partir de micro-organismos (Tabela 3). Trabalhos realizados a partir da transformação do limoneno, α -pineno e β -pineno são relativamente abundantes, sendo o α -Terpineol um dos compostos de interesse mais comumente citados.

Tabela 3: Relação de trabalhos envolvendo biotransformação de terpenos por diferentes organismos.

Referência	Espécie	Precursor / substrato	Resultado
Lindmark-Henriksson, 2003	<i>Picea abies</i> (célula vegetal)	β -pineno	Trans-pinocarveol

Maróstica Júnior e Pastore, (2007a).	<i>Penicillium sp.</i>	D-Limoneno	α -Terpineol
Bicas <i>et al.</i> , (2008).	<i>Pseudomonas sp</i>	β -pineno, α -pineno e limoneno	α -Terpineol
Demyttenaere, Bellegheem e Kimpe (2001)	<i>Aspergillus niger</i>	Linalol	Geraniol, nerol, citral e citrol.
Demyttenaere, Vanorschelde e Kimpe (2004).	<i>Penicillium sp</i>	Citronelol	Cis-óxido de rosa
Schewe <i>et al.</i> , (2006)	<i>Penicillium digitatum</i>	D-Limoneno	α -Terpineol

2.3.1 Limoneno

O limoneno, 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno, um monoterpene monocíclico está presente na estrutura de mais de 300 vegetais (Burdock 1995). Pode-se citar alguns de seus derivados mais notáveis como os compostos oxigenados α -Terpineol, álcool perílico, carveol, carvona e mentol. Mentol e carvona são compostos de aroma extensivamente utilizados, sendo que o álcool perílico vem ganhando destaque crescente devido às comprovações relacionadas a seu poder de prevenção de doenças degenerativas (MARÓSTICA JÚNIOR, 2006). Frutas cítricas possuem elevadas concentrações de limoneno (ARCE *et al.*, 2007; DIAZ; ESPINOSA; BRIGNOLE; 2004; YADAVA *et al.*, 2004; STEINBRECHER *et al.*, 1999), por conseguinte, seus resíduos podem ser de grande interesse.

Apesar da existência de várias rotas metabólicas para a biotransformação do limoneno, de acordo com Maróstica Júnior e Pastore (2007b) muitos estudos revelam o efeito inibidor do limoneno em vários micro-organismos. Segundo os mesmos autores, seis rotas principais de conversão do limoneno podem ser distinguidas (Figura 1): oxidação do substituinte metila a compostos perílicos; conversão da dupla ligação do anel ao diol correspondente; oxidação alílica a cis, trans carveóis e carvona; epoxidação da ligação dupla na unidade isoprenil a α -Terpineol; oxidação alílica a isopiperitenol e epoxidação da ligação 8,9 a limoneno-

8,9-epóxido.

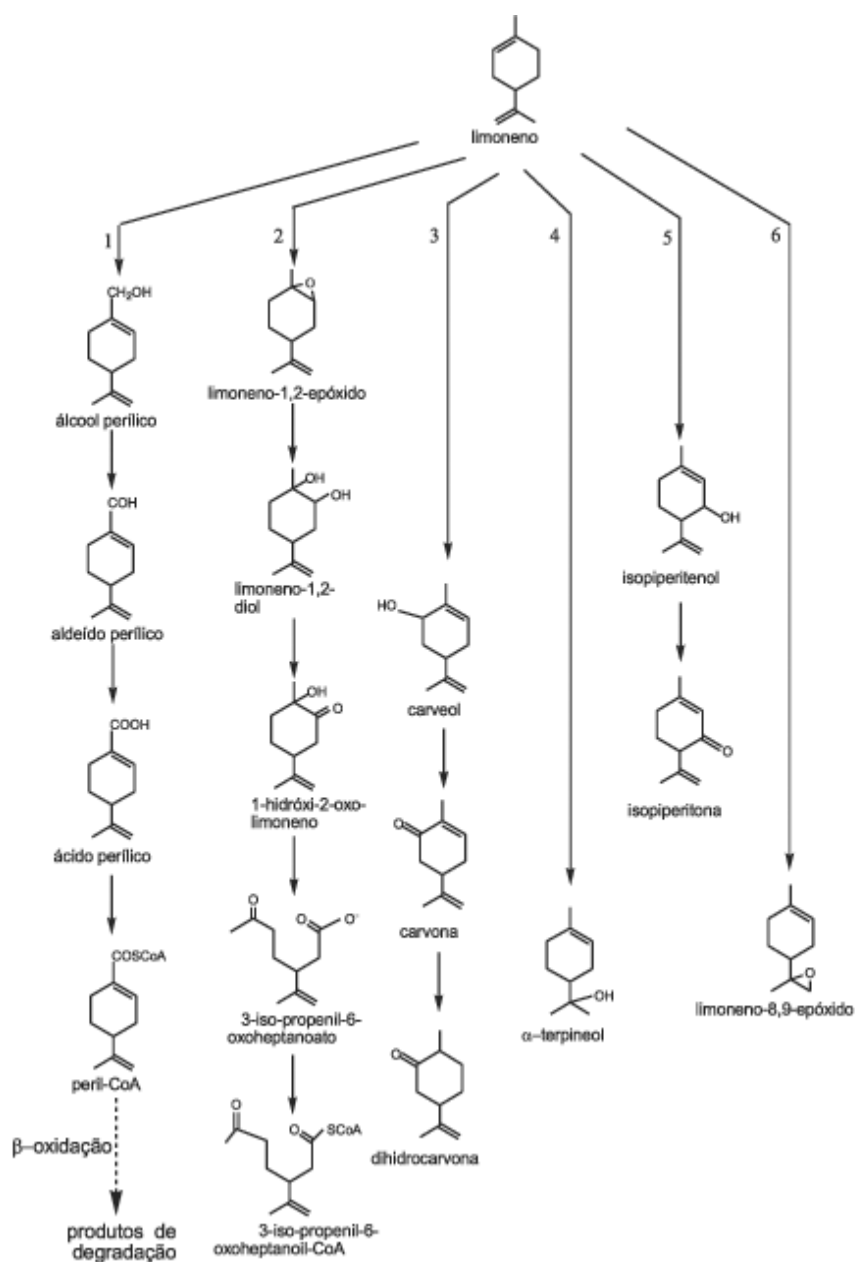


Figura 1: Principais rotas envolvidas na biotransformação do limoneno (Fonte: MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007b)

2.3.2 Álcool Perílico

O álcool perílico (AP) é um derivado do limoneno de maior valor. Sua importância em tratamentos de câncer já é altamente difundido. O álcool perílico é

um monoterpreno isolado dos óleos essenciais de menta, cerejas e sementes de aipo, dentre outras plantas. Estudos em animais mostram que o AP é um agente quimioterápico eficaz na regressão de tumores de mama, pâncreas, fígado e próstata, e agente quimiopreventivo nos tumores de cólon, melanomas e neuroblastomas (FISCHER *et al.*, 2005).

A produção biotecnológica de álcool perílico já foi descrita por Oliveira e Strapasson, (2000); Menéndez *et al.*, (2002) e de ácido perílico por Mirata, Heerd e Schrader (2009) (Tabela 4). Não há muitos trabalhos a respeito da produção deste composto.

Tabela 4: Biotransformação para produção de álcool perílico e ácido perílico

Referência	Produto da Biotransformação	Substrato da biotransformação	Valor obtido	Tempo	Micro-organismo
Oliveira e Strapasson (2000)	Álcool Perílico	R-(+)-limoneno	Não estabelecida	60 h	<i>Fusarium verticilloides</i>
Mirata, Heerd e Schrader	Ácido Perílico	R-(+)-limonene	7.94 g	168 h	<i>Pseudomonas putida</i>

2.3.3 Carvona

Carvona é definido por Carvalho e Fonseca (2006) como tendo odor de hortelã doce. Carvona tem grande importância como fragrância e sabor, relevância na área médica e outras aplicações.

O terpeno carvona tem sido utilizado há vários séculos como fragrância e sabor através da utilização das sementes de alcarávia e hortelã-comum. As suas sementes, cujo óleo contém entre 50% e 70% de (4S)-(+)-carvona, têm sido utilizadas como aromatizante de pão (*rye*), queijo, chucrute, doces, carne, molhos e licores. A carvona tem sido utilizada ultimamente, sobretudo nos Países Baixos, no armazenamento a longo prazo de batatas. A carvona impede de forma mais eficaz do que os produtos químicos utilizados habitualmente para que as batatas grelem, ao mesmo tempo em que apresenta uma menor toxicidade para o ser

humano. Além disso, este terpeno apresenta propriedades anti-fúngicas e anti-bacterianas (CARVALHO; FONSECA, 2006).

Pouquíssimos trabalhos registraram a produção de carvona (Tabela 5). A produção biotecnológica de carvona usando limoneno como precursor já foi descrita em alguns estudos (CARVALHO; FONSECA, 2003; VANEK; VALTEROVA; VALSAR, 1999), porém publicações a respeito do assunto são bastante escassas.

Tabela 5: Biotransformação para produção de carvona

Referência	Substrato da biotransformação	Concentração obtida	Tempo de fermentação	Organismo
Vanek, Valterova e Vaisar (1999)	(S)-(-)-limoneno	34% - 24 mg	10 dias	<i>Solanum aviculare</i> (célula de planta)
Carvalho e Fonesca (2003)	(+)-(R)-limoneno	Não estabelecida	5 dias	<i>Rhodococcus opacus</i>

2.3.4 α -Terpineol

R-(+)- α -Terpineol tem um odor tipicamente de Lilás (*Syringa L*), enquanto (S)-(-)- α -Terpineol tem um odor de fragrâncias mais coníferas. α -Terpineol é um dos compostos de aroma mais comumente utilizados. É em sua maioria produzido quimicamente e está comercialmente disponível em baixo custo (MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007a).

O α -Terpineol é um álcool geralmente estável produzido por síntese química ácido-catalisada a partir de α -pineno ou óleo de terebentina. É um importante produto comercial, normalmente aplicado em sabonetes, cosméticos e preparações de flavor (BAUER; GARB; SUBURG, 2001). A biotransformação de limoneno para α -Terpineol como principal produto já foi descrita por fungos *Cladosporium sp*, *Penicillium digitatum*, *Oxysporum* e *Fusarium*. Para as bactérias, este caminho de conversão tem sido relatado em *Pseudomonas gladiolos*, um recombinante de *Escherichia coli* e *P. fluorescens* (BICAS et al., 2008).

A produção de α -Terpineol por meio da biotransformação tem sido registrada por alguns autores, tendo sua concentração máxima descrita de 3,2 g/L (Tabela 6).

Tabela 6: Trabalhos relatando a obtenção do α -Terpineol por biotransformação

Referência	Substrato da biotransformação	Concentração obtida	Tempo de fermentação	Micro-organismo
Maróstica Júnior e Pastore (2007a)	Óleo essencial de laranja	450 mg /L	3 dias	<i>Fusarium oxysporum</i>
Tan, Day e Cadwallader, (1998)	R-(+)-Limoneno	3200 mg/L	1 dia	<i>Penicillium digitatum</i>
Bicas <i>et al.</i> , (2008)	R-(+)-Limoneno	2400 mg/L	3 dias	<i>Fusarium oxysporum</i>

2.3.5 Limoneno-1,2-diol

De acordo com Maróstica Júnior e Pastore (2007b), há relatos anteriores de Limoneno-1,2-diol ser o produto de biotransformação majoritário em leveduras e fungos filamentosos e um produto minoritário obtido através de biotransformação com linhagens de bactérias. Uma linhagem de *Cladosporium* sp também se mostrou capaz de atacar a ligação 1,2 do limoneno resultando em *cis*- e *trans*diol como produtos principais, gerando concentrações finais de 0,2 e 1,5 g/L (VAN DER WERF; SWARTS; DE BONT, 1999). A relação de trabalhos tendo Limoneno-1,2-diol como produto final é relativamente escassa (Tabela 7).

Tabela 7: Trabalhos relatando a biotransformação para produção do Limoneno-1,2-diol

Referência	Substrato da biotransformação	Valor obtido	Micro-organismo
Carvalho <i>et al.</i> (2000).	<i>cis</i> -limonene-1,2-epoxide	94.1% (rendimento)	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Mukherjee, Kraidman e Hill (1973).	D-limonene	1,5 g/L	<i>Cladosporium</i> sp

Segundo informações do site da empresa *The Good Scents Company*

(2011) o limoneno-1,2-diol ou limoneno glicol é um composto que possui odor de menta fresca, de aplicação em alimentos e reconhecido como seguro (GRAS).

2.3.6 α -pineno e β -pineno

O pineno, de fórmula molecular $C_{10}H_{16}$, é um terpeno bicíclico que pode ser encontrado nos óleos essenciais de alecrim, cipreste, cominho, lavanda e também na terebentina, um líquido incolor obtido a partir da destilação da resina de algumas coníferas – especialmente de *Pinus eliottii* aqui no Brasil. Pouco solúvel em água, trata-se de um componente que apresenta dois isômeros ópticos ativos: o alfa e o beta pineno, ambos com massa molar de 136,24 g/mol e com 88,16% de carbono e 11,84% de hidrogênio. São termicamente instáveis, como diversas outras substâncias dos óleos essenciais, inflamáveis e podem ser obtidos (por biossíntese) a partir do geranyl pirofosfato, um precursor dos terpenos (AZAMBUJA, 2009).

O α -pineno e β -pineno são monoterpenos largamente distribuídos na natureza, além de também serem resíduos industriais com valor comercial reduzido (YOO; DAY, 2002). Coníferas como as diferentes espécies de *Pinus* possuem elevadas concentrações destes terpenos (LUDLEY *et al.*, 2009; KUPCINSKIENE; STIKLIENE; JUDZENTIENE, 2008; SEMIZ *et al.*, 2007; LIN; OWEN; PEÑUELAS, 2006; FISHER; PHILLIPS, 2008).

2.3.7 Outros terpenóides

Ao utilizar-se de resíduos agroindustriais obviamente não se tem em mãos um substrato homogêneo, com apenas um terpeno. Apesar dos resíduos agroindustriais empregados no presente estudo possuírem predominantemente limoneno e α - e β -pinenos, uma série de outros terpenos estará presente em menores concentrações. Considerando-se o bagaço de maçã, bagaço de laranja e os substratos de *Pinus* poderão estar presentes também canfeno, mirceno, p-cimeno, terpinoleno, cadineno, sabineno, longifoleno, germacreno, linalol,

terpineno, α -felandreno, 3-careno, espatunelol, α -farneceno, citral, entre outros (LUDELEY *et al.*, 2009; KUPCINSKIENE; STIKLIENE; JUDZENTIENE; 2008; SEMIZ *et al.*, 2007; LIN; OWEN; PEÑUELAS; 2006; ARCE *et al.*, 2007; DIAZ; ESPINOSA; BRIGNOLE; 2004; YADAVA *et al.*, 2003; STEINBRECHER *et al.*, 1999; FISHER; PHILLIPS, 2008; SHASHIREHKA *et al.*, 2008).

2.5 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A fermentação submersa tem como característica principal a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis.

A técnica de fermentação submersa possui relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante a homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros do processo, principalmente se monitorados por sensores adequados. Entretanto, a maior probabilidade de contaminação, pela maior quantidade de água, é um inconveniente deste processo (PINHEIRO, 2006).

2.6 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo que se refere a cultura de micro-organismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido substrato ou meio umidificante ligado a ela está em um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O resultado da fermentação é que uma substância seja quebrada em compostos mais simples. Em alguns casos a fermentação é usada para modificar um material cuja modificação seria difícil ou muito cara se métodos químicos convencionais fossem escolhidos. A fermentação é sempre iniciada por enzimas formadas nas células dos organismos vivos.

O crescimento do micro-organismo e a formação de produtos podem ocorrer na superfície e/ou dentro do sólido. Esse sistema composto de quatro

fases (suporte insolúvel, água, biomassa e ar) torna o monitoramento do processo mais complicado do que na fermentação submersa. Tais obstáculos reduzem a capacidade de controle da fermentação; contudo, nessas condições, é possível controlar parâmetros com temperatura, agitação, taxas de aeração e composição de gases. Esse último é relevante para produção de enzimas por fungos na FES. (SAID; PIETRO, 2002).

Os micro-organismos industrialmente importantes usados em FES são aqueles que crescem naturalmente sobre frutos e grãos como: *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Penicillium* ou aqueles que crescem sobre madeira, palha e outros resíduos florestais e subprodutos agrícolas. Proteases, amilases, pectinases, lactase amiloglicosidase e renina fúngica são exemplos de enzimas produzidas por fungos utilizando fermentação de substrato sólido (SAID; PIETRO, 2002).

Estudos feitos nos últimos anos deram origem a uma série de novos processos, bem como a muitas publicações científicas, demonstrando as vantagens desse método de fermentação, especialmente quando se trabalha com fungos filamentosos. A técnica de FES é conhecida pela sua produção de metabólitos, na maioria dos casos em níveis muito maiores que a fermentação submersa. Além disso, é caracterizada por processos mais baratos, além da possibilidade de aproveitamento de resíduos agroindustriais, celulósicos ou amiláceos (PANDEY *et al.*, 2001). A tabela 8 mostra comparações entre fermentação submersa e FES.

Tabela 8: Comparação entre FES e Fermentação Submersa

Fermentação no Estado Sólido	Fermentação Submersa
Meio de cultura não flui livremente	Meio de cultura sempre flui livremente
Altura do meio limitado	Altura do meio variável com o biorreator
Consumo limitado de água, baixa atividade de água (a_w), sem efluentes	Grandes quantidades de consumo de água e descarte de efluentes
Baixa capacidade de transferência de calor	Fácil controle de temperatura
Fácil aeração e grande área de contato ar/substrato	Aeração requer elevado fluxo
Substrato tampão	Fácil controle de pH

Condições estáticas	Boa homogeneização
Equipamentos industriais disponíveis	Necessita de projetos
Inoculação de esporos, batelada	Fácil inoculação, processo contínuo
Risco de contaminação por fungos de crescimento lento	Risco de contaminação por bactérias do ácido láctico
Baixo consumo de energia	Elevado consumo de energia
Pequenos volumes e baixos custos de equipamentos	Grandes volumes e elevado custo tecnológico

Fonte: Holker e Lenz (2004); Raimbault (1997).

2.6.1 Fatores físicos e químicos

Os fatores que afetam o crescimento microbiano e a fermentação em estado sólido estão divididos em físicos e químicos. De acordo com Tortora, Case e Funke (2005), Os fatores físicos incluem temperatura, pH e pressão osmótica. Os fatores químicos necessários incluem fontes de carbono e nitrogênio, enxofre, fósforo, oligoelementos, oxigênio e fatores orgânicos de crescimento.

2.6.1.1 Temperatura

Grande parte dos micro-organismos cresce bem nas temperaturas ideais para os seres humanos. Entretanto existem micro-organismos, principalmente bactérias, capazes de sobreviver em temperaturas extremas.

Cada espécie microbiana cresce a uma temperatura específica mínima, ótima e máxima. A temperatura mínima de crescimento é considerada a menor temperatura em que a espécie é capaz de crescer. A temperatura ótima de crescimento é aquela em que a espécie apresenta o melhor crescimento. A temperatura máxima de crescimento é a temperatura mais alta em que ainda é possível haver crescimento (TORTORA; CASE; FUKU, 2005). A temperatura na qual um organismo se desenvolve é amplamente determinada pelas temperaturas nas quais suas enzimas atuam (BLACK, 2001). Alguns autores estudaram a

influência da temperatura na biotransformação do limoneno. A relação das temperaturas utilizadas para biotransformação do limoneno consta na tabela 9.

Tabela 9: Temperaturas utilizadas na biotransformação do limoneno

Referência	Substrato da biotransformação	Produto formado	Micro-organismo	Temperatura
Maróstica Júnior e Pastore (2007a)	Óleo essencial de laranja	α -Terpineol	<i>Fusarium oxysporum</i>	30°C
Tan, Day e Cadwallader, 1998	R-(+)-Limoneno	α -Terpineol	<i>Penicillium digitatum</i>	28°C
Bicas <i>et al.</i> , 2008	R-(+)-Limoneno	α -Terpineol	<i>Fusarium oxysporum</i>	26°C
Carvalho <i>et al.</i> , 2000.	cis-limonene-1,2-epoxide	Limoneno-diol	Células de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Ambiente
Lindmark-Henriksson (2003).	R-(+)-Limoneno	Limoneno-(1,2)-epóxido	<i>Picea abies</i>	24°C

2.6.1.2 pH

Como outras proteínas, as enzimas são afetadas pelo aquecimento e por níveis extremos de pH. Mesmo pequenas mudanças de pH podem alterar a carga elétrica e vários grupamentos químicos nas moléculas enzimáticas, alterando, portanto, a habilidade da enzima de se ligar ao seu substrato e catalisar uma reação. As enzimas microbianas funcionam em ótimos de temperatura e pH, que estão relacionados ao ambiente normal do micro-organismo (BLACK, 2001). Logicamente, são as enzimas que catalisam as reações de biotransformação também. Por este motivo é importante considerar o pH como um fator importante a ser considerado, afetando as concentrações de produtos formados e em alguns casos podendo até mesmo alterar o produto formado. A influência da variável pH

na biotransformação do limoneno foi estudada por vários autores. A relação dos pH utilizados para biotransformação do limoneno consta na tabela 10.

Tabela 10: pH utilizado na biotransformação do limoneno

Referência	Substrato da biotransformação	Produto formado	Micro-organismo	pH
Maróstica Júnior e Pastore (2007a)	Óleo essencial de laranja	α -Terpineol	<i>Fusarium oxysporum</i>	6,0
Tan, Day e Cadwallader, 1998	R-(+)-Limoneno	α -Terpineol	<i>Penicillium digitatum</i>	4,5
Carvalho, Keulen e Fonseca, 2000.	cis-limonene-1,2-epoxide	Limoneno-diol	Células de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	pH natural do meio
Vatek, Valterova e Vaisar (1999)	(S)-(-)-limonene	Carvona	<i>Solanum aviculare</i> (célula de planta)	pH natural do meio

2.6.1.3 Osmolaridade

Os micro-organismos necessitam de água para seu crescimento, pois sua célula é composta por cerca de 80 a 90% de água e a maioria dos nutrientes solúveis é retirada da água presente no meio ambiente.

2.6.1.4 Atividade de água

A presença da água no produto pode ser medida de diferentes formas, mas nem todos os métodos indicam a disponibilidade da água para os micro-organismos, uma vez que nem toda a água do produto está igualmente disponível. A disponibilidade da água em materiais higroscópicos, tais como frutos e derivados é melhor caracterizada pela atividade de água (A_w) ou pela umidade de

equilíbrio com a umidade relativa do ar ambiente. A atividade de água e a umidade relativa, quando se estabelece o equilíbrio, são numericamente iguais (HALL, 1980; BROOKER; BAKKER-ARKEMA; HALL, 1992).

A desidratação osmótica é um processo que remove água dos alimentos sólidos. Como a atividade de água nos alimentos está relacionada com o crescimento de micro-organismos e efetivação de reações químicas, a retirada de água reduz o crescimento destes micro-organismos e impede reações bioquímicas que dependem da umidade, evitando a rápida perda que ocorre nos frutos *in natura*. Trata-se, portanto, de uma forma de conservação dos alimentos (PARK; BIN; BROD, 2001). Em seus estudos, Adambounou, Castaigne e Dillon (1983) encontraram que o valor ótimo de atividade de água para o crescimento de micro-organismos encontra-se entre 0,92 e 0,99.

2.6.1.5 Relação Carbono:Nitrogênio (C:N)

Quando se quer avaliar a adequabilidade de um substrato como suprimento de nutrientes, uma característica importantíssima a se considerar é denominada relação C:N. Esta relação indica a proporção de carbono para nitrogênio na composição do material orgânico e, nos fornece informações sobre esses nutrientes essenciais para o crescimento de micro-organismos.

A relação Carbono/Nitrogênio passa a ser interessante no momento em que se estabelece um objetivo para a utilização de um substrato em um processo fermentativo. Esta relação terá influência no metabolismo do micro-organismo utilizado, alterando as concentrações e tempo de produção de determinados produtos. Quando se esgota a concentração de Nitrogênio, cessa-se o crescimento do micro-organismo, este por sua vez, continua a utilizar o carbono presente, porém podendo passar a produzir metabólitos secundários e não mais primários como de início.

2.7 SUBSTRATOS

A economia brasileira é uma das mais importantes economias agrícolas do mundo, produzindo café, cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas, etc. A maior parte dos produtos são exportados, o que contribui para o desenvolvimento econômico. Porém, a grande produção é responsável pela geração de grande quantidade de resíduos que causam sérios problemas ambientais (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Pelo fato do Brasil ser um grande gerador produtos agrícolas industrializados, há no cenário nacional, inúmeras oportunidades para o estabelecimento de atividades industriais voltadas ao beneficiamento e/ou reprocessamento de biorresíduos. A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos, além de originar substratos alternativos, também auxilia na resolução de problemas relacionados à poluição ambiental (SILVA *et.al.*, 2003)

2.7.1 Resíduo da laranja

Em 2008, foram colhidos no Brasil 836.602 hectares de laranja, gerando uma produção de 18.538.084 toneladas e um valor de produção de R\$ 5,1 bilhões, o que representou 29,3% do valor da produção brasileira alcançado pelas frutíferas. A cultura está concentrada em São Paulo, responsável por 78,4 % da produção brasileira, e onde estão localizadas as maiores processadoras de laranja, tornando o estado o maior produtor da fruta no mundo, e também o maior produtor e exportador de suco (IBGE, 2009).

A nova safra de laranja (2011/12) do cinturão citrícola de São Paulo e Minas Gerais, onde é produzida praticamente toda a matéria-prima utilizada pelas empresas exportadoras de suco do país, deverá aumentar para 387 milhões de caixas de 40,8 quilos, conforme previsão divulgada pela Associação Nacional dos Fabricantes de Sucos Cítricos (CitrusBR). É o primeiro levantamento do gênero divulgado pelas indústrias em dez anos. Apesar da ausência de uma base de comparação, a entidade reconhece que a região colherá uma "grande safra".

Especialistas ouvidos pela Reuters na semana passada previram que a safra de São Paulo, que responde por 85% da produção brasileira de laranja, deverá crescer entre 15% e 25% ante o ciclo anterior e alcançar cerca de 350 milhões de caixas (NOTÍCIAS AGRÍCOLAS, 2011).

O processamento de suco de laranja é uma das mais importantes indústrias do mundo. Ela produz uma enorme quantidade de resíduo de processo (TING; ROUSEFF; 1983). Isto constitui aproximadamente 50% do peso e provê excelentes modelos para produtos de valor agregado. A casca e outros bioprodutos são secos e comercializados como ração animal, entretanto o preço de venda do produto é baixo e a evaporação da água consome largas quantidades de calor. (GROHMANN; BALDWIN, 1992). De acordo com Ashbell (1992) o bagaço da laranja compreende cerca de 42% do total da fruta. Mahmood, Greenman, e Scragg (1998) verificaram a existência de 46% de bagaço, casca e sementes, recuperando 54% de suco.

Resíduos resultantes do processamento de sucos de laranja já foram utilizados em alguns estudos. Rossi *et al.* (2009) utilizou a polpa cítrica como substrato da fermentação no estado sólido com o fungo *Ceratocystis fimbriata* para a produção de acetato de isoamila e acetato de etila; Mahmood, Greenman e Scragg (1998) utilizaram bagaço de laranja para produção de enzimas extracelulares; Rodrigues (2006) utilizou a polpa cítrica para produção de ácido cítrico através de fermentação no estado sólido.

2.7.2 Bagaço de maçã

O departamento de Estado de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) estimou a colheita de pêra e maçã para o ano 2011 dos países que compreendem o Hemisfério Sul. Referiu-se à produção da África do Sul, Argentina, Austrália, Brasil, Chile e Nova Zelândia. Globalmente a soma da produção destes países será similar ao ano 2010 (4,9 milhões de toneladas). No que se refere especificamente ao Brasil, o relatório diz que teremos uma queda de 9% na produção total, ou seja, que chegaria a 1.120.000 de toneladas (PERSICO, 2010)

Para o mercado interno não alcançará as 800.000 toneladas; a exportação diminuiria cerca de 85.000 toneladas. Por problemas de qualidade a indústria superaria as 250.000 toneladas e se espera um ingresso máximo de 85.000 toneladas de maçã importada (PERSICO, 2010).

O bagaço ou resíduo de maçã consiste da torta resultante da prensagem das maçãs apresentando consideráveis problemas de poluição ambiental. Por conter elevado teor de umidade quando descartado, propicia o rápido crescimento de micro-organismos (BRAMORSKI, 1997).

O principal subproduto da agroindústria da maçã, o bagaço, pode representar de 20 a 40% da quantidade total de maçã processada; atualmente está sendo utilizado na alimentação animal ou simplesmente dispensado no solo como adubo orgânico. Trata-se de um material altamente instável do ponto de vista microbiológico, com elevado conteúdo de compostos fermentáveis e, devido à sua constituição, pode causar hiper-alcoolemia no gado além de seu descarte acarretar problemas ambientais. Apesar disso, o bagaço pode ser considerado um produto excelente para fins biotecnológicos; pode ser utilizado para a produção de etanol, aromas, gás natural, ácido cítrico, pectinas, enzimas e cogumelos, além de outros processos como extração de fibras e carvão vegetal, (NOGUEIRA *et al.*, 2005).

Em virtude de seu elevado conteúdo de açúcares, o bagaço de maçã se torna um substrato em potencial, para utilização em processos biotecnológicos, atuando como fonte de carbono para micro-organismos; sua conversão em produtos mais nobres vem aumentando nos últimos anos (VENDRUSCOLO *et al.*, 2008).

Em várias pesquisas se tem utilizado o bagaço de maçã como fonte de carbono para micro-organismos, dentre elas: produção de ácido cítrico (SHOJAOSADATI; BABAEIPOUR, 2002), ácido láctico (GULLÓN *et al.*, 2008), enzimas (ZHENG; SHETTY, 2000) e etanol (NGADI; CORREIA, 1992).

2.7.3 *Pinus*: Casca, cepilho e acícula de *Pinus*

Espécies de *Pinus* são plantadas em todo mundo, e valorizadas pelas seguintes características: Madeira de cor clara, variando de branca a amarelada; madeira de fibra longa, apropriada para fabricação de papel de alta resistência para embalagens; papel de imprensa e outros tipos de papel; possibilidade de extração de resina, em escala comercial, em algumas espécies; rusticidade e tolerância, possibilitando o plantio em solos marginais para agricultura e, assim, agregar valor à terra com a produção adicional de madeira, formação de cobertura protetora do

solo e reconstrução de ambiente propício à recomposição espontânea da vegetação nativa em ambientes degradados; valor ornamental para arborizações e paisagismo. No Brasil, os *Pinus* vêm sendo plantados há mais de um século, tendo sido, inicialmente, introduzidos para fins ornamentais. Somente a partir de 1950 é que foram plantadas em escala comercial para produção de madeira. O principal uso deles é como fonte de matéria-prima para as indústrias de madeira serrada e laminada, chapas, resina, celulose e papel. O estabelecimento e o manejo de florestas plantadas com *Pinus* vem possibilitando o abastecimento de madeira que, anteriormente, era suprido com a exploração do pinheiro brasileiro. Assim, essa prática estabeleceu-se como uma importante aliada dos ecossistemas florestais nativos pois vem suprimindo uma parcela cada vez maior da necessidade atual de madeira. (EMBRAPA, 2009)

As cascas de *Pinus* representam entre 10 a 15% do peso total da árvore (KOFUJITA; ETTYU; OTA, 1999). A casca de pinus descartada dos processos de produção ainda é atrativa e importante fonte renovável de biomassa, ainda que possua alto teor de polifenóis e baixa concentração de carboidratos. A casca removida da derrubada de árvores é mais utilizada como combustível para caldeira, fertilizante, cobertura material, removedor de materiais pesados e inibidor de corrosão (KU; SATHISHKUMAR; MUN, 2007). De acordo com Souza – Sebrae (2009) o desperdício no corte da madeira nas serrarias e madeireiras chega a 20%. De acordo com EMBRAPA (2009) A demanda de madeira de *Pinus* era de 40 milhões de metros cúbicos em 2005 e deverá crescer para 78 milhões no ano 2020.

Estudos acerca das espécies de *Pinus* envolvem principalmente a caracterização dos óleos essenciais e utilização como bioindicadores. Hwang, Wade e Sericano (2003) realizaram a caracterização dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes nas acículas de *Pinus* da Coréia, México e Estados Unidos; Al-Alawi e Mandiwana (2007) utilizaram as acículas de *Pinus* como biondicadores para os metais pesados Pb, Cd, Cu e Zn; Klánová *et al.* (2009) utilizou as acículas de *Pinus* como indicadores dos níveis de poluição do ar. Ku, Sathishkumar e Mun estudaram a afinidade da ligação de proantocianidinas da casca *Pinus radiata* em tendão de colágeno tipo I bovina, rica em prolina.

2.8 ESTATÍSTICA

As estatísticas podem ser compreendidas como um conjunto de ferramentas que envolvem o estudo de métodos e procedimentos para a coleta, classificação e análise de dados. As ferramentas estatísticas também oferecem os meios para a execução de suposições científicas de dados resumidos. A estatística é de grande importância para o planejamento, delimitação e análise de qualquer trabalho de pesquisa. No seguinte estudo, além das ferramentas estatísticas comuns como média e desvio padrão os dados foram plotados em Diagramas de Pareto e tabelas de ANOVA.

2.8.1 Diagrama de Pareto

O diagrama de Pareto é um gráfico de barras que ordena as frequências das ocorrências, da maior para a menor, permitindo a priorização de problemas. Mostra ainda a curva de percentagens acumuladas. Sua maior utilidade é a de permitir uma fácil visualização e identificação das causas ou problemas mais importantes, possibilitando a concentração de esforços sobre os mesmos (ACTION, 2011).

2.8.2 Tabela de ANOVA

ANOVA é uma coleção de modelos estatísticos no qual a variância amostral é particionada em diversos componentes devido a diferentes fatores (variáveis), que nas aplicações estão associados a um processo, produto ou serviço. Através desta partição, a ANOVA estuda a influência destes fatores na característica de interesse (ACTION, 2011).

2.8.3 Coeficiente de correlação e de determinação

Tanto a regressão linear como a previsão são calculadas com os parâmetros que definem uma curva (ou linha) que melhor represente a amostra. Os dados organizados fornecidos de uma amostra com duas variáveis são próximos o suficiente de uma linha reta que ela pode ser representada dessa maneira. O coeficiente de correlação r está no intervalo $(-1 \leq r \leq 1)$ e mede a proximidade da amostra de uma linha reta. Quanto mais próxima a amostra estiver de uma linha reta, mais próximo $|r|$ estará de 1 e mais próximos estarão os pontos previstos do comportamento da amostra (HEWLETT-PACKARD DEVELOPMENT COMPANY, 2011).

O quadrado do coeficiente de correlação resulta no coeficiente de determinação, que indica o poder de explicação do modelo, em função das variáveis independentes consideradas. Na regressão múltipla, a medida relativa de adequação do ajuste é chamada de coeficiente de determinação múltipla e é designada pelo símbolo R^2 . É a relação entre a variação explicada pela equação de regressão múltipla e a variação total da variável dependente. Assim, $R^2 = 0,70$ significa que 70% de variância é explicada pelo modelo. O coeficiente de determinação é um número no intervalo (MARINHO, 2007). Assim, este coeficiente é uma medida de qualidade do modelo em relação à sua habilidade de estimar corretamente os valores da variável resposta, sendo o valor aceito na literatura acima de 0,70 ou 70%.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Diversas etapas de um processo biotecnológico foram compreendidas no presente estudo. O diagrama geral das etapas realizadas ao longo deste trabalho é apresentado na figura 2.

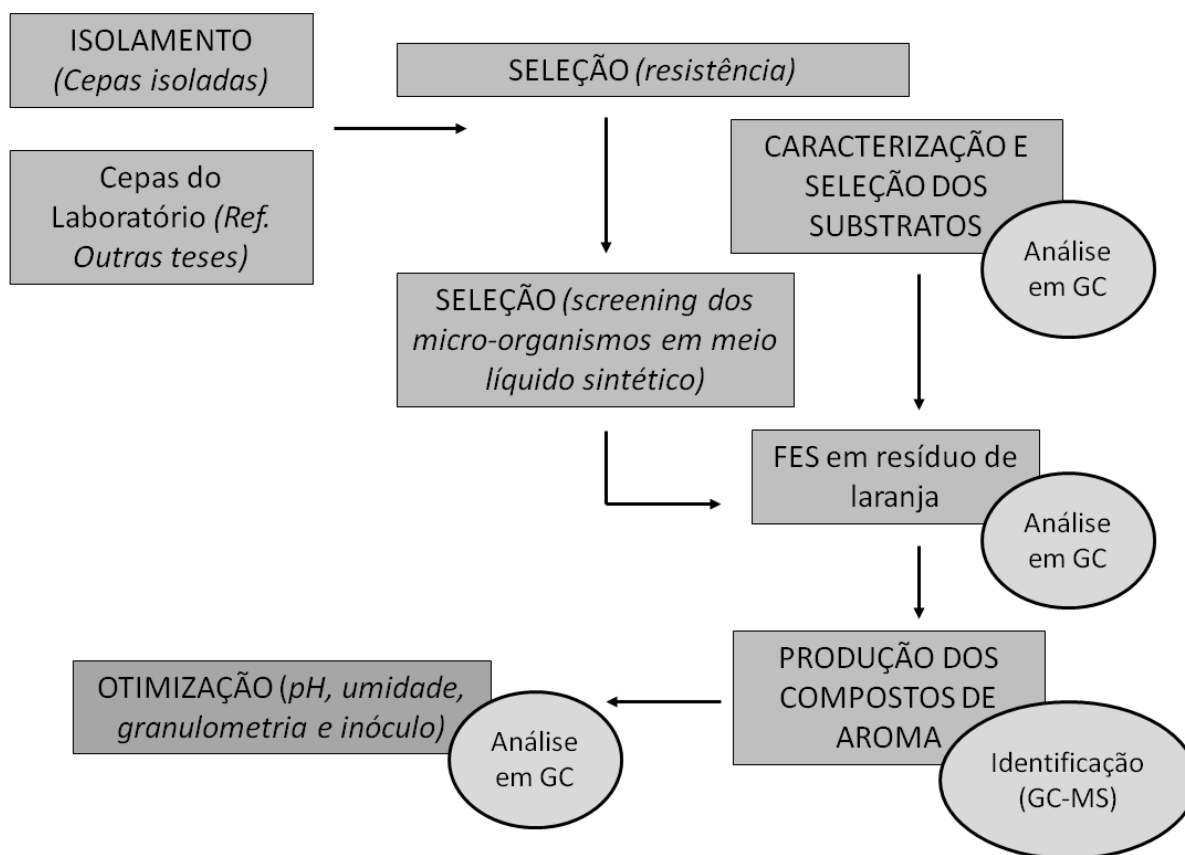


Figura 2: Fluxograma geral das etapas realizadas no presente estudo.

3.1 SUBSTRATOS

No presente estudo três substratos foram preparados e caracterizados para posterior utilização.

3.1.1 Resíduo de laranja

O resíduo da extração do suco de laranjas pêra (casca + bagaço) foi obtido de uma cantina localizada no interior do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O substrato foi picado e secado em estufa com circulação de ar e então moído e classificado.

3.1.2 Bagaço de maçã

O bagaço de maçã utilizado no presente trabalho foi cedido pela empresa “Agrícola Fraiburgo”, localizada na Rodovia SC 453 - Km 50, município de Videira, Santa Catarina.

O bagaço gerado no processo industrial é uma mistura oriunda das maçãs, Fuji, Gala entre outras. Quando as maçãs são recepcionadas na indústria, elas são armazenadas todas juntas. As variedades de maior volume são Fuji e Gala, outras também utilizadas na indústria são a *Granny Smith*, *Pink Layed*, Colorida, Imperial, Catarina, Joaquina e Eva. Após recepcionadas, as maçãs recebem uma lavagem por chuveiros e escovas, para então serem moídas em triturador tipo martelo. Após isso, o bagaço resultante passa por uma centrífuga de alta rotação, onde temos a separação da casca/semente e a polpa. A casca/semente, juntamente com uma parte de polpa é prensada, em prensa tipo cintas e então o material resultante é levado ao silo de armazenagem de bagaço.

3.1.3 Casca e acícula de *Pinus*

Tanto as acículas quanto as cascas de *Pinus* (*Pinus taeda*) foram coletadas na sede florestal da empresa Arauco Forest Brasil, localizada no município de Campo do Tenente, no estado do Paraná. As acículas foram coletadas do solo, já apresentando coloração marrom. A casca foi coletada de troncos de árvores derrubadas.

3.1.4 Cepilho de *Pinus*

O cepilho de *Pinus* (*Pinus ellioti*) foi coletado na madeireira Aliança – Madeiras Brutas e Beneficiadas, localizada Curitiba- PR. Este cepilho é um resíduo de tamanho superior ao da serragem, resultante do corte da madeira.

3.2 PREPARO DOS SUBSTRATOS

Os substratos foram secos em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 60 °C com a finalidade de evitar contaminação durante sua armazenagem, além de facilitar a moagem. Posteriormente foram triturados em moinho de facas e classificados granulometricamente entre 2 e 3 mm; entre 2 mm e 0,8 mm e abaixo de 0,8.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS

Os substratos foram caracterizados quanto ao teor de nitrogênio, lipídios, cinzas, umidade e carboidratos. Além disso, foi determinada a composição terpênica dos substratos. Os métodos utilizados foram os físico-químicos para análise de alimentos preconizados pelas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008) e estão relacionados na tabela 11.

Tabela 11: Métodos utilizados para caracterização físico-química dos substratos.

Análise	Metodologia empregada
Proteínas / Nitrogênio	Método de Kjeldahl;
Lipídios	Extração em Soxhlet, utilizando éter etílico como solvente
Cinzas	Incineração em mufla a 550°C
Umidade	Método termogravimétrico: 105° - 110°C até peso constante da amostra
Açúcar redutor e total	Medidos através do método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1945).
Relação C:N	Analizador CHNS-O Thermo Flash2000

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DOS SUBSTRATOS

3.4.1 Extrações com GLP

O aparato para extração semelhante ao utilizado por Oliveira (1997) com o gás GLP foi utilizado. Segundo Oliveira (1997), o equipamento portátil é constituído de duas partes: corpo A e corpo B (Figura 3). O corpo **A**, construído em aço inoxidável, possui em uma das extremidades uma válvula (1) de alimentação do solvente (gás liquefeito), 2 conjuntos de telas (2 e 3), para evitar o entupimento da válvula de alimentação do solvente e problemas de bloqueio e/ou entupimento das válvulas posteriores contidas no corpo **B** (6 e 9): a dos compartimentos de separação e a que permite a transferência do extrato para o frasco coletor. O corpo **B** é constituído de duas câmaras (C e D) com partes tubulares de vidro para visualização da operação de separação das fases (aquosa e orgânica). O conjunto formado pelas câmaras **C** e **D** comunica-se com o exterior pela válvula 9, possibilitando a transferência do extrato para um frasco coletor (Fc), por uma agulha, sem contato do mesmo com o meio ambiente. A montagem do conjunto é feita momentos antes do processo de extração (aproximadamente 5 min). A estanqueidade do conjunto é assegurada pelo uso de anéis de elastômero de borracha nitrílica (4, 5, 7 e 8), colocados entre cada componente do extrator (tubos de vidro e válvulas). As válvulas, confeccionadas em teflon e aço inoxidável, que em condição de repouso permanecem normalmente fechadas, são operadas pela compressão de um pequeno pino voltado para a parte externa da referida válvula (P' e P'').

Há duas diferenças do equipamento descrito originalmente por Oliveira (1997) e o utilizado no presente estudo. Uma das diferenças refere-se à válvula que foi redesenhada, que antes funcionava por compressão e agora funciona como uma válvula agulha. Outra diferença é a presença do êmbolo que foi adicionado para comprimir o material que está sendo extraído.

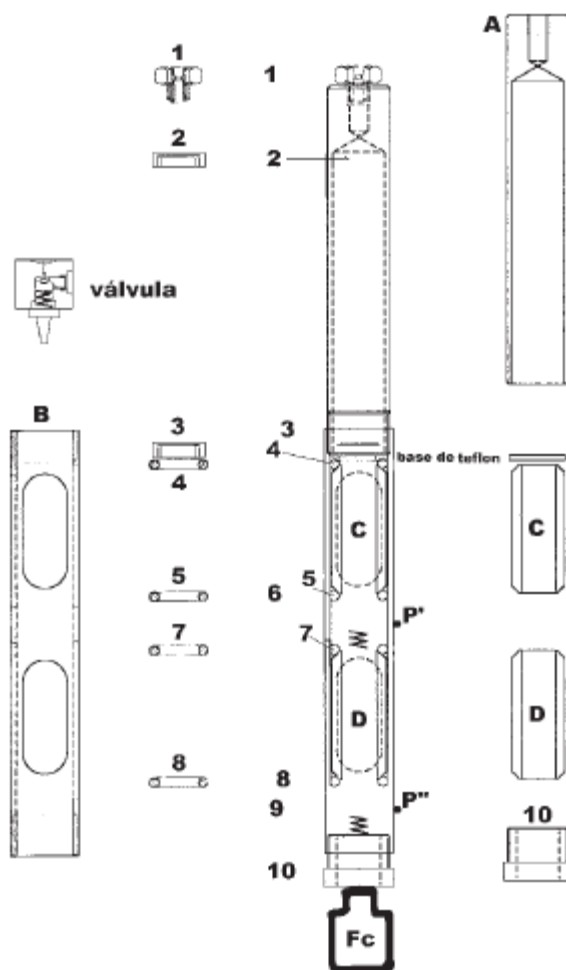


Figura 3: Modelo descritivo do extrator utilizado na extração com GLP. Fonte: Cunico *et al.*, 2003.

Utilizou-se 15 g de gás butano da marca Volcano® no extrator em séries de duas lavagens por amostra. Utilizando uma agulha acoplada ao extrator, o extrato foi transferido a um frasco de penicilina lacrado que foi posteriormente flasheado até a retirada de todo o gás. Hexano PA foi adicionado para a análise cromatográfica em uma diluição de 1:10 de extrato/solvente. A composição do gás utilizado é de propano (C_3H_8) 25% \pm 5% e iso-butano + n-butano 75% \pm 5%.

3.4.2 Extrações com hexano

A extração ocorreu em aparelho de Soxhlet utilizando o solvente hexano. Esta metodologia foi descrita nas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008) e também utilizada por Silva *et al.* (2005), o qual encontrou em seus estudos de extração de óleo essencial de pimenta rosa, o hexano como melhor solvente para obtenção dos terpenos.

A amostra foi pesada em balança analítica e transferida para o cartucho. O cartucho foi acoplado ao extrator, o qual foi encaixado ao balão volumétrico. Sobre o cartucho, foi vertido o hexano. O condensador foi conectado a parte superior do extrator e a manta de aquecimento conectada ao balão volumétrica. A extração durou no mínimo 8 ciclos.

3.4.3 Extrações com diclorometano e n-pentano

A metodologia foi adaptada a partir da utilizada por Shashirekha *et al.* (2007). 5 gramas de substrato foram submetidas a extração utilizando 150 mL de uma solução de diclorometano e n-pentano 1:1 por 3 vezes. Esta solução foi previamente mantida *overnight* a - 25°C. Posteriormente, utilizou-se sulfato de sódio anidro para retirada da umidade das amostras. As amostras foram concentradas em coluna de Vigreux a uma temperatura inferior a 35°C.

3.5 MICRO-ORGANISMOS

Foram testadas 13 cepas do fungo filamentoso de gênero *Rhizopus*, proveniente dos seguintes bancos internacionais de cultura: NRRL – *Northern Regional Research Laboratory (U.S Department of Agriculture, USA)*; ATCC – *American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA)*; MUCL – *Micoteca da Universidade Católica de Louvain (Bélgica)*; 2 cepas do fungo filamentoso *Trichoderma sp*; 1 cepa do fungo filamentoso *Ceratocystis fimbriata* e 3 cepas de leveduras; Além dos micro-organismos isolados, os quais receberam numerações

de 1 à 4 de acordo com o substrato de isolamento, seguidos por uma letra. Durante os experimentos, devido ao elevado número de cepas e de etapas do trabalho os micro-organismos foram separados por códigos (Tabela 12).

Tabela 12: Códigos utilizados para os micro-organismos disponíveis no banco de cepas do Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB).

Espécie	Origem / Classificação	Código
<i>Rhizopus microsporus</i>	ATCC 46436	2
<i>Rhizopus delemar</i>	ATCC 34612	3
	MUCL 28168	13
<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 28627	4
	MUCL 395	12
<i>Rhizopus oligosporus</i>	NRRL 3267	5
<i>Rhizopus circicans</i>	NRRL 1475	6
<i>Rhizopus sp</i>	X	7
<i>Rhizopus arrhizus</i>	MUCL 28425	8
	MUCL 2582	11
	MUCL 16179	15
<i>Rhizopus stolonifer</i>	MUCL 28169	14
<i>Rhizopus formosa</i>	MUCL 28422	20
<i>Trichoderma harzianum</i>	LPB 193	9
	LPB 221	10
<i>Pichia stipitis</i>	ATCC 5376	16
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	ATCC 10022	17
<i>Pachysolen tannophilus</i>	X	18
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	CBS 374-83	19

3.5.1 Isolamento dos micro-organismos

Visando obter micro-organismos resistentes e que pudessem biotransformar terpenos, foram isoladas cepas a partir de materiais ricos em terpenos. Estes foram provenientes da área de reflorestamento da empresa Arauco Forest do Brasil, em Campo do Tenente (PR). Vidros estéreis foram levados para campo e amostras de cascas, acículas e pinhas foram coletadas. Após coleta, em laboratório, os micro-organismos foram isolados de duas maneiras distintas. A primeira por raspagem do material com alça de platina e inoculação em meio de cultura YM estéril. Após 48 horas a amostra foi plaqueada em agar. A segunda maneira foi realizada por imersão da amostra em água

peptonada e posterior inoculação em placa contendo ágar batata dextrose (PDA). Posteriormente, as colônias obtidas nas placas foram plaqueadas novamente e assim sucessivamente até obter-se uma cultura isolada pura.

3.5.2 Preparo do inóculo

A produção de esporos dos fungos filamentosos foi de forma semelhante à utilizada por Bramorski (1997) e Soares (1998). Foi realizado em Erlenmeyers de 250 mL com 40 mL de PDA. Os Erlenmeyers foram inoculados com alça de platina estéril, e incubados em estufa a 30°C durante 168 horas. A coleta dos esporos ocorreu com a adição de 25 mL de água destilada estéril com uma gota de *Tween* 80 ao meio esporulado. O frasco foi submetido à agitação magnética por um período de 15 minutos. No caso dos gêneros *Rhizopus*, os esporos foram coletados com o auxílio de uma alça estéril e transferidos para água destilada estéril. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer após as diluições necessárias. Para o fungo isolado 3a não foi possível realizar as contagens uma vez que este não apresentava esporos, por este motivo o volume de inóculo adotado para tal fungo foi fixado em 4 mL.

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células} \times F \times 1.000 \times 1/V}{q \times 16}$$

Onde, F = fator de diluição

V = 1/volume do retículo (mm³)

q = Número de quadrículos contados

As leveduras foram inoculadas em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL do meio YM, sob agitação contínua de 120 rpm, temperatura de 28°C, durante um período de 48 h. Após as diluições necessárias as células de leveduras foram contadas em câmara de Neubauer.

3.5.3 Manutenção das cepas

As cepas a serem testadas e posteriormente utilizadas no estudo em questão foram mantidas em PDA (fungos) ou ágar YM (leveduras) por transferência periódica a cada quatro meses sob refrigeração de 4°C.

3.6 SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

A metodologia para seleção de micro-organismos resistentes a terpenos foi adaptada a partir das empregadas por Demyttenaere, Bellghem e Kimpe (2001) e Maróstica Júnior (2006). Foram utilizados meios de cultura PDA e ágar YM para fungos filamentosos e leveduras respectivamente em Erlenmeyers de 125 mL, contendo α -pineno 98% e β -pineno 99% e outra com R-(+)-limoneno 97% (Sigma–Aldrich). As concentrações iniciais dos terpenos foram de 0,2% a 1% em relação à quantidade de meio. A taxa de inóculo foi de 10^6 /mL de meio para os fungos e leveduras, com exceção do fungo isolado 3a, ausente de esporos, onde foram inoculados 4 mL da suspensão. O tempo de experimento foi de 7 dias, a 30°C, com acompanhamento diário do crescimento. O inóculo foi adicionado sobre a superfície do meio, uma vez que testes preliminares não demonstraram diferença com relação ao *pour plate*.

3.7 TESTE DE FONTE DE CARBONO

Realizou-se o teste de fonte de carbono em Erlenmeyers contendo 40 mL de meio mineral (Tabela 13) e 1% de limoneno/1% de α -pineno e β -pineno. A taxa de inóculo utilizada foi de 10^6 células ou esporos/mL e pH igual a 5,9. Conduziu-se o teste por sete dias sob agitação contínua de 120 rpm e temperatura de 30°C. Como controle utilizou-se o meio mineral contendo apenas 1% glucose (v/v), sem os terpenos.

A biomassa das leveduras foi calculada após filtração em membrana com

poros de 0,22 μm de diâmetro. Após a filtração a biomassa foi calculada a partir do peso seco. A biomassa dos fungos filamentosos em fermentação submersa foi calculada através do peso seco após filtração a vácuo em papel filtro.

Tabela 13: Composição do meio mineral (BICAS; PASTORE, 2007).

Composição	Quantidade (g/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1,42
NaCl	0,50
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,40
CaCl_2	0,60
KCl	2,15
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
ZnSO_4	0,01
CuSO_4	0,01
Glucose*	10

*Apenas no controle

3.8 BIOTRANSFORMAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO SINTÉTICO

Após as etapas de seleção e resistência aos terpenos, a biotransformação de compostos de aroma foi estudada no mesmo meio utilizado no teste de fonte de carbono, na mesma temperatura e agitação (30°C/120 rpm), com adição de 20 g/L de glicose para fungos filamentosos e 10 g/L de leveduras e fermentação por um período de 7 dias. Limoneno, α -pineno e β -pineno foram testados como substratos para a biotransformação, a uma concentração de 1% (v/v). Em ensaios preliminares esta etapa foi acompanhada pela análise cromatográfica do *headspace* dos cultivos. Foram testadas um total de dez cepas. Posteriormente, optou-se pela análise de um extrato dos cultivos. Alíquotas de 4 mL do caldo fermentado foram extraídas com 2 mL de hexano e analisados por cromatografia gasosa. Os produtos gerados a partir da transformação de terpenos foram ainda identificados por espectrometria de massa (GC-MS). É importante ressaltar que

controles negativos inoculados contendo apenas glucose sem os terpenos e um controle negativo sem os micro-organismos em estudo foram analisados.

A determinação da biomassa foi realizada por balanço de massa assim como descrito no item 3.7.

3.9 BIOTRANSFORMAÇÃO EM MEIO SÓLIDO

O resíduo de laranja foi selecionado como substrato para fermentação em estado sólido devido a seu alto teor de limoneno (5,36%) em detrimento do baixo teor de terpenos dos outros substratos testados. Em Erlenmeyers de 250 mL foram introduzidos 20 g de resíduo da laranja seco. O teor de água inicial foi ajustado de acordo com a capacidade máxima de absorção do substrato em 80%. O pH inicial do meio não foi ajustado. A princípio também foi testada uma mistura de bagaço de maçã e resíduo da laranja (1:1).

Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. O fungo isolado 3a e o *Rhizopus* 5 foram cultivados em meio sólido, assim como a levedura isolada Y4b e a levedura *Pichia stipitis*. Um frasco contendo meio não inoculado sob as mesmas condições dos fermentados foi utilizado como controle negativo da fermentação. Todos os experimentos foram realizados a 30°C e analisados conforme o consumo de açúcares redutores ao longo da fermentação.

3.10 ESTUDO DO TIPO DE INÓCULO

O inóculo do fungo selecionado, o isolado 3a foi preparado de quatro maneiras distintas visando a melhor forma de inoculação para os experimentos em estado sólido. Foram realizados dois testes de inóculo.

3.10.1 Primeiro teste de inóculo

Os métodos de preparo do inóculo foram os seguintes: (1) Crescimento por

7 dias em PDA e raspagem do fungo com auxílio de uma barra magnética após a adição de 25 mL de água deionizada estéril. Inoculação de 4 mL em forma de suspensão; (2) Crescimento do fungo em PDA contendo 1% de limoneno (v:v) por 7 dias. Após este período 4 fragmentos do meio contendo o fungo desenvolvido foram cortados e o fungo foi inoculado; (3) Inoculação de 4g de resíduo da laranja previamente inoculados com o fungo já crescido após 7 dias de inoculação. O meio foi retirado e pesado do frasco original em ambiente estéril e inoculado.

3.10.2 Segundo teste de inóculo

Posterior a esta seleção do inóculo foi realizada outra em adição com 5 inóculos diferentes. Três deles tratavam-se do fungo crescido em PDA após 5, 6 e 7 dias e o outro inóculo testado foi proveniente do resíduo de laranja já fermentado.

O quinto inóculo testado foi em forma de *pellets* (figura 4). Este inóculo em forma de *pellets* foi cultivado por um período de 5 dias em um meio natural a base de extrato de laranja adicionado de sulfato de amônio (5 g/L). O extrato foi preparado com a adição de 10 mL de água /g de substrato seco e colocado em banho-maria em temperatura de água fervente por 20 minutos. O extrato foi filtrado e separado em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL em cada um deles. Após adição de sulfato de amônio o meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C. Duas alçadas contendo fragmentos do micélio do fungo isolado 3a foram adicionadas ao meio.

O crescimento do inóculo ocorreu a temperatura de 30°C, sob agitação de 120 rpm, no caso do inóculo líquido. A análise destes inóculos teve caráter visual, verificando-se com qual deles o desenvolvimento do fungo ocorreu de forma mais rápida e completa no meio de cultivo.



Figura 4: Inóculo em forma de *pellets* crescido em extrato aquoso do resíduo da laranja.

3.11 OTIMIZAÇÃO DA BIOSTRANSFORMAÇÃO EM MEIO SÓLIDO

Foram utilizados planejamentos experimentais para estudar os principais fatores que influenciam na biotransformação do limoneno por FES. Os planejamentos experimentais foram elaborados utilizando o programa Statistica® versão 5.0. Foram realizados ensaios com o objetivo de estudar os efeitos do pH, umidade, taxa de inóculo e granulometria do substrato de acordo com os métodos citados por Barros Neto *et al.*, 2001.

Um primeiro planejamento fatorial com 4 fatores e três repetições do ponto central foi aplicado (Tabela 14). Devido a sua importância relatada na literatura e a impossibilidade de trabalhar com demais variáveis de interesse, as seguintes variáveis independentes foram estudadas: umidade, pH, volume de inóculo e granulometria. Os níveis estudados para umidade foram: 60% (-1), 70% (0) e 80% (+1), pH 4,0(-1), 5,0(0) e 6,0 (+1), volume de inóculo 2mL (-1), 4 mL (0) e 6 mL (+1) e granulometria menor que 0,8 mm (-1), entre 0,8 a 2,0 (0) e maior que 2,0mm (+1).

Tabela 14: Primeiro planejamento fatorial com três repetições no ponto central para as

variáveis pH, umidade, taxa de inóculo e granulometria.

Ensaio	Umidade	pH	Granulometria	Volume de inóculo
1	+1	+1	+1	+1
2	+1	+1	-1	-1
3	+1	-1	+1	-1
4	+1	-1	-1	+1
5	-1	-1	-1	-1
6	-1	-1	+1	+1
7	-1	+1	-1	+1
8	-1	+1	+1	-1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

Um segundo planejamento fatorial completo com 3 fatores e três repetições do ponto central foi aplicado (Tabela 15). A a variável umidade foi fixada em 80%. As seguintes variáveis independentes foram estudadas: pH, taxa de inóculo e granulometria. Os níveis estudados para pH foram 4,0 (-1), 5,0 (0) e 6,0 (+1), taxa de inóculo 2mL (-1), 4 mL (0) e 6 mL (+1) e granulometria menor que 0,8 mm (-1), entre 0,8 a 2,0 (0) e maior que 2,0mm (+1).

Tabela 15: Segundo planejamento fatorial com três repetições no ponto central para as variáveis pH, taxa de inóculo e granulometria.

Ensaio	pH	Granulometria	Taxa de inóculo
1	+1	+1	+1
2	+1	+1	-1
3	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1
5	-1	+1	+1
6	-1	-1	+1
7	-1	+1	-1
8	-1	-1	-1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Outra fermentação foi realizada utilizando os valores do ensaio 1 do segundo planejamento experimental (umidade 80%, pH 6,0, granulometria 2mm+ e taxa de inóculo 6,0 mL). O objetivo desta fermentação foi realizar uma cinética com relação à alteração de pH, umidade, açúcares, biomassa e concentração de produtos de biotransformação ao longo da fermentação.

3.12 ANÁLISES DO FERMENTADO EM ESTADO SÓLIDO

3.12.1 Umidade e pH

A umidade foi medida por diferença gravimétrica, com secagem até peso constante da amostra. O pH foi medido retirando-se 5g do fermentado úmido em um frasco contendo 50 mL de água deionizada e deixando sob agitação constante com o auxílio de uma barra magnética e um agitador. O fermentado foi agitado por 10 minutos e o pH medido.

3.12.2 Açúcares

Os açúcares foram medidos através do método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945). Os açúcares redutores foram determinados adicionando aproximadamente 1 g de fermentado seco a um frasco junto a 50 mL de água. A mistura foi levada a banho-maria fervente por 10 minutos. O volume foi completado para 100 mL e filtrado. Em um tubo de ensaio, foi adicionado 1 mL da solução de amostra e 1 mL do reativo A de Somogyi-Nelson e a mistura foi aquecida por 10 minutos em banho-maria. Após o resfriamento, 1 mL do reativo B de Somogyi-Nelson B e 7 mL de água foram adicionados. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 535 nm. Os açúcares totais foram determinados seguindo procedimento semelhante, no entanto com adição de 2 mL de ácido clorídrico ao frasco contendo aproximadamente 1 g de amostra e 50 mL de água. A mistura foi levada a banho-maria por 20 minutos e após o resfriamento, foi neutralizada com solução de hidróxido de sódio 40% (g/mL). A seguir, procedeu-se de maneira semelhante. Um tubo branco foi preparado contendo água no lugar da amostra.

3.11.3 Análise dos compostos voláteis

Análises preliminares através do *headspace* dos fermentados líquidos e sólidos foram realizadas para todas as cepas selecionadas em etapas anteriores. Os meios líquidos fermentados foram submetidos à extração com hexano, analisados por cromatografia gasosa e identificados por espectrometria de massa. Procedeu-se a extração no quinto dia de fermentação, após a retirada de uma alíquota de 4 mL do meio líquido e adição de 2 mL de hexano. Após agitação, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi separado para posterior análise. O meio sólido fermentado foi submetido à extração utilizando o método de extração com GLP, descrito no item 3.1.3.2 com a utilização de 25g de substrato em peso úmido (80% de Umidade). Para as fermentações em estado sólido foi adicionado 1 mL de solvente em relação à quantidade total obtida de extrato em cada um dos ensaios do planejamento experimental.

A metodologia empregada para análise dos voláteis foi baseada na adotada por Demyttenaere, Vanorschelde e Kimpe (2004). O equipamento utilizado foi um Cromatógrafo a Gás GC-17A da marca Shimadzu, com detector de ionização de chama, coluna HP-5 (30 m x 0,32 mm) e nitrogênio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 250° C, do detector de 280°C, utilizando-se programação de temperaturas do forno inicialmente a 40°C durante 2 minutos e aumentando 5°C por minuto até 150° C. De 150°C a 170°C houve um aumento de 10° C/ min e a partir daí um aumento de 30°C/ min até a temperatura final de 250°C, mantendo-se nesta temperatura por 2 minutos. O *split* utilizado foi de 1:5 para headspace e 1:40 para análises dos extratos. Para análise dos extratos em hexano, os resultados foram expressos em % de área do pico do produto em relação a área do pico de limoneno. Para análise dos extratos da fermentação em estado sólido os resultados foram expressos em g/L com base na porcentagem de extrato obtido em relação ao substrato.

Assim, para as fermentações a concentração dos compostos foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{Concentração} = \frac{\text{Área de produto} \times \text{Conc. inicial de limoneno}}{\text{Área inicial do limoneno}}$$

Em parceria com o Laboratório de Combustíveis Automotivos (LACAUT_{ETS}, UFPR) foi realizada a identificação dos compostos voláteis resultantes dos processos fermentativos em estudo. Um cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas (GC-MS) da marca Varian, modelo CP 3800/Saturn 2000 equipado com a coluna CP-Sil 8 CB (30 m x 0,25 mm) foi utilizado para identificação dos compostos. A temperatura inicial foi de 60 °C com elevação de 3 °C/minuto até 250 °C. O split foi de 1/200. A faixa de varredura foi de 30 a 500 m/z. A identificação foi realizada em comparação com a biblioteca NIST 98 MS *Library* (VARIAN, 1998) em adição a bibliografia específica (ADAMS, 2007). Os índices de retenção linear e a retenção teórica confirmaram as identificações.

Apesar de a técnica GC-MS ser uma poderosa ferramenta em análise qualitativa, muitas vezes as bibliotecas utilizadas poderiam não ser completas ou eficientes o suficiente para caracterizar completamente alguns compostos, sendo que o índice de retenção pode auxiliar neste propósito, evitando-se assim uma identificação equivocada (VIEGAS; BASSOLI, 2007).

O índice de retenção de um componente é obtido por interpolação, relacionando o tempo de retenção do componente em estudo com o tempo de retenção de dois padrões (geralmente hidrocarbonetos) eluídos antes e após o pico do composto de interesse (INCZEDY; LENGYEL; URE, 2008).

Uma mistura padrão de n-alcenos foi utilizada para calcular o índice de retenção linear (LRI) de cada composto na amostra. O padrão (1 µL) destes alcenos foi injetado no sistema GC-MS e seus respectivos tempos de retenção são usados como padrão externo de referência para o cálculo do LRI, juntamente com os tempos de retenção de cada composto de interesse. O LRI de cada componente foi calculado conforme a equação a seguir:

$$LRI = 100 * \left(\frac{t_c - t_n}{t_{n+1} - t_n} + n \right)$$

Onde: LRI - índice de retenção linear; t_c - tempo de retenção do composto de interesse; t_{n+1} - tempo de retenção do hidrocarboneto posterior; n - nº de carbonos do hidrocarboneto anterior.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO

A Tabela 16 mostra as características físico-químicas dos substratos analisados.

Tabela 16: Composição físico-química do bagaço de maçã, resíduos de laranja e cepilho de *Pinus*.

Constituintes	Bagaço de maçã	Resíduo de laranja	Cepilho de Pinus
Umidade (%)	3,06 ± 0,08	14,2 ± 0,14	13,03 ± 0,075
Açúcares redutores (%)	19,75 ± 0,75	10,13 ± 0,99	*
Açúcares totais (%)	32,84 ± 1,09	21,13 ± 1,57	15,27 ± 0,71
Proteínas (%)	4,01	5,69	*
Cinzas (%)	1,64 ± 0,03	3,20 ± 0,12	0,671 ± 0,093
Lipídios (%)	4,06 ± 0,15	2,89 ± 0,15	1,54 ± 0,6
Carbono/Nitrogênio (%)	40,24	31,70	*

*Não determinado

A composição físico-química do bagaço de maçã e do resíduo de laranja sugerem que estes materiais possuem grande potencial para utilização de substrato para o crescimento de micro-organismos, principalmente devido ao elevado teor de açúcares redutores (19,75% e 10,13%) e totais de ambos 32,84% e 21,13%). Outro aspecto importante é a elevada relação carbono/nitrogênio do bagaço de maçã (40,24) e do resíduo de laranja (31,70).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO SUBSTRATO

A Tabela 17 mostra a caracterização dos voláteis de cada um dos substratos estudados. O principal objetivo desta etapa foi verificar quantitativamente qual dos substratos possuía a maior concentração de terpenos. Não existindo uma metodologia padrão para análise de terpenos, testaram-se distintos métodos, os quais foram comparados quanto sua eficiência na extração

destes voláteis.

Tabela 17: Porcentagem de extrato obtido da acícula e cepilho de *Pinus*, resíduo de laranja e bagaço de maçã por diferentes métodos de extração testados.

Amostra	GLP (Butano-Propano) (%)	Sohxlet (hexano) (%)	Diclorometano / n-pentano (%)
Acícula de <i>Pinus</i>	2,32 ± 0,02	4,13 ± 0,81	3,355 ± 0,225
Cepilho de <i>Pinus</i>	0,6 ± 0,1	1,545 ± 0,605	1,535 ± 0,145
Bagaço de Maçã	2,1 ± 0,72	3,22 ± 0,53	2,715 ± 0,195
Resíduo de Laranja	5,36 ± 0,46	3,875 ± 0,815	2,21 ± 0,175

Na Tabela 18, são apresentadas as concentrações de limoneno, β -pineno e α -pineno para os substratos analisados. Com estes resultados, pode-se seleccionar o substrato mais apropriado para a biotransformação de terpenos em fermentação no estado sólido.

Tabela 18: Concentração em porcentagem de limoneno, α -pineno e β -pineno no extrato.

Amostra	Método	R-(+)-Limoneno (%)	β -pineno (%)	α -pineno (%)
Acícula de <i>Pinus</i>	Diclorementano / n-pentano	0,87 ± 0,23	13,83 ± 3,83	1,08 ± 0,34
	GLP	0,48 ± 0,17	7,37 ± 3,07	0,57 ± 0,19
	Sohxlet (hexano)	1,25 ± 0,22	3,76 ± 1,31	0,70 ± 0,07
Cepilho de <i>Pinus</i>	Diclorementano / n-pentano	0,697 ± 0,15	8,43 ± 1,81	2,99 ± 0,59
	GLP	0,38 ± 0,092	6,34 ± 1,24	2,93 ± 0,63
	Sohxlet (hexano)	2,414	3,850	0,787
Bagaço de Maçã	Diclorementano / n-pentano	*	*	*
	GLP	0,499	0,516	*
	Sohxlet (hexano)	3,419 ± 2,18	2,28 ± 0,84	0,64 ± 0,24
Resíduo de Laranja	Diclorementano / n-pentano	94,749	0,291	0,191
	GLP	95,32 ± 0,94	0,4 ± 0,04	0,235 ± 0,005
	Sohxlet (hexano)	84,45 ± 0,08	0,313 ± 0,103	0,145 ± 0,04

* Compostos não detectados.

A maioria dos substratos obtidos foi previamente investigada na literatura quanto às concentrações esperadas dos terpenos em estudo. Deve-se considerar, entretanto, que os substratos em estudo são resíduos e dificilmente se acha na literatura um trabalho de investigação de composição de voláteis de um resíduo. Já se esperava que o bagaço de maçã fosse constituído de uma baixa quantidade de monoterpenos. Villatoro *et al.* (2007) achou como único terpeno na maçã pink lady, o limoneno, mas apenas em concentrações traço. Algo muito semelhante com o encontrado no presente estudo onde o principal monoterpeno encontrado foi o limoneno em concentrações baixas (3,42% do extrato). Em concentrações mais baixas ainda foi encontrado α -pineno (0,64% do extrato) e β -pineno (2,28% do extrato). Echeverría *et al.*, (2008) também obtiveram limoneno como único terpeno estudando a maçã Mondial Gala. Shashirekha *et al.*, (2008) encontrou em maçãs *Annona squamosa* α -pinene, β -pinene, linalol, Δ -germacreno, e espatulenol.

Quanto aos resíduos de *Pinus*, diferente do constatado na literatura, valores muito baixos foram encontrados. O valor máximo encontrado de β -pineno foi de 13,83% no extrato da acícula (*Pinus taeda*) e 2,99% de α -pineno no extrato do cepilho (*Pinus ellioti*). Na literatura são encontrados comumente valores elevados para α -pineno e β -pineno, sendo estes os componentes que mais se destacam no óleo essencial. Krassimir *et al.*, (2006) encontrou até 62,01 % de α -pineno, 10,56 % de β -pineno e 3,57 % de limoneno no óleo essencial de *Pinus*. Semiz *et al.*, (2007) obteve de 43,7 % a 89 % de α -pineno, de 1,2 a 10,3 % de β -pineno e de 1,3 a 4,9% de limoneno. Barnola, Cedeño e Hasegawa (1997) encontraram valores não tão altos em *Pinus caribae*, como 8,25 % de α -pineno, 2,31 % de β -pineno e 5,64 % de limoneno. A maioria dos valores encontrados na literatura para α -pineno são bastante elevados e apontam esse monoterpeno como o principal constituinte do óleo essencial. Não era esperada uma concentração tão baixa de α -pineno e β -pineno nos resíduos provenientes dos dois diferentes gêneros de *Pinus* coletados. Isto pode ser explicado já que a descrição da composição do óleo essencial de *Pinus* obtido pela literatura se trata de espécimes novas e não aquelas coletadas na forma de resíduos agrícolas, proveniente do solo de

florestas. Apesar da composição do óleo essencial de *Pinus* ter uma grande variação conforme a espécie estudada, não foram encontradas análises com tão baixas concentrações destes monoterpenos.

O resíduo de laranja por sua vez apresentou uma porcentagem de 5,36% de óleo essencial em sua composição e uma composição bastante significativa de limoneno (95.32%), principalmente na extração com o gás butano (método GLP), valor de óleo essencial muito superior ao obtido pelo método Soxhlet (3,88%) e Diclorometano/n-pentano (2,21%). Valores elevados de limoneno são bastante encontrados na literatura para o óleo essencial da laranja. Danielski *et al.*, (2008) obteve 95,95% e Steinbrecher *et al.*, (1999) obteve 88,21%. Devido ao elevado teor de limoneno do resíduo de laranja, mesmo quando comparado ao substrato natural, este foi o substrato escolhido para a fermentação em estado sólido. Devido a performance do método GLP em relação os demais este foi escolhido como método de análise para etapas posteriores.

Os substratos a base de *Pinus* além de não terem correspondido às expectativas quanto às concentrações de monoterpenos (Tabela 18) também possuíam uma caracterização físico-química que dificultaria o desenvolvimento dos micro-organismos (Tabela 16). Outros materiais como a polpa cítrica e a casca de *Pinus* também foram investigados quanto a composição de terpenos, entretanto não se mostraram adequados como substratos, pois não detectou-se voláteis em sua composição. Uma vez que a polpa cítrica é secada a altas temperaturas e passa por processos de extração, é normal que não tenha sido encontrado limoneno em sua composição.

4.2.1 Comparação entre os métodos de extração de terpenos

Os três métodos utilizados conduziram a diferenças a serem observadas. Em relação à composição dos substratos, não se observou grandes alterações quando utilizados os diferentes métodos, mas sim, diferentes percentagens dos extratos.

Os métodos Soxhlet e diclorometano/n-pentano possuíam uma quantidade

de lavagens diferentes definidas por seus respectivos métodos, de maneira que no sohxlet não é controlado o número de ciclos, mas o tempo de extração. A extração do hexano em Soxhlet teve em média 8 ciclos por amostra, enquanto que no método do diclorometano/n-pentano foram 3, e no método do GLP apenas 2, uma vez que foi realizada uma curva de extração para se verificar a quantidade de extrato obtido nos dois primeiros ciclos. Este fato pode interferir no resultado de forma a beneficiar o método com maior número de ciclos. Salienta-se que em todos os casos após o número de lavagens citadas, em uma lavagem subsequente os solventes utilizados já apresentariam incolores, de forma que o composto colorido já havia sido totalmente extraído. Todavia, é preciso considerar que os demais compostos da amostra não necessariamente teriam sido totalmente extraídos, uma vez que não necessariamente teriam afinidade pelo solvente semelhante ao composto que dava a coloração ao extrato.

Ao notar-se a diferença da quantidade de extratos para cada um dos métodos (Tabela 17) nota-se um destaque do método GLP para o resíduo de laranja (5,36%), do método Soxhlet para acícula de *Pinus* (4,13%) e bagaço de maçã (3,22%) e um equilíbrio entre o método Soxhlet e o diclorometano/n-pentano para o cepilho de *Pinus* (1,54%). Esta diferença poderia ser atribuída a fatores como composição do extratos e afinidade dos solventes. Acredita-se que o hexano extraía junto com os terpenos, compostos mais pesados e cerosos presentes no bagaço da maçã e resíduos de *Pinus*, algo observado após as extrações não só com Soxhlet, mas também com diclorometano/n-pentano, porém em menor quantidade. Uma vez que a quantidade de terpenos verificada nestas extrações foram baixas para estes substratos (Tabela 18), pode-se concluir que havia muitos compostos que não eram de interesse na composição destes extratos. Uma vez que método GLP foi eficaz para a extração do óleo essencial do resíduo da laranja (5,36%) com alta concentração de limoneno (95,32%) acredita-se que os gases butano/propano presentes no GLP extraíam este terpeno com maior facilidade, resultando numa quantidade maior de extrato, uma vez que os compostos cerosos e pesados estavam ausentes no resíduo da laranja.

Outro fato a ser observado é uma vantagem do método GLP com relação

aos demais. Este método por não utilizar aquecimento, o torna um processo mais estável e evita que possa haver modificações na composição das amostras. Nota-se a presença de alguns compostos diferentes nos demais métodos quando comparados ao GLP como α -fencheno, linalol, mirceno e hidroxitolueno butilado, exclusivos do método GLP. Em determinadas amostras observou-se hidrato de trans sabineno e 2,2 dimetil-1-pentanol, ausentes neste método. Poderiam ter sido formados em função do aquecimento, a partir da modificação de compostos já existentes ou que desapareceram dos extratos que utilizaram calor.

O método GLP comparado aos demais foi conduzido por um número pequeno de lavagens, duas, as quais atingem 83,1% de eficiência de extração para o resíduo de laranja, quando comparadas aos 100% que seria obtido com cinco lavagens. Devido a pouca eficiência a partir da terceira lavagem (5 – 7%), as limitações do tempo e a grande quantidade de amostras analisadas, decidiu-se realizar apenas as duas lavagens, de forma que com 5 lavagens a quantidade de extrato de laranja chegaria a 6,56%, algo que não compromete os resultados obtidos, mas faz com que os valores obtidos sejam subestimados.

4.3 GC-MS DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO SUBSTRATO

A Tabela 19 mostra uma comparação qualitativa na composição dos diferentes substratos de cepilho e acícula de *Pinus*, em relação ao método de extração empregado. Como observado por diversos autores (LUDLEY *et al.*, 2009; KUPCINSKIENE; STIKLIENE; JUDZENTIENE, 2008; SEMIZ *et al.*, 2007; LIN; OWEN; PEÑUELAS, 2006; FISHER; PHILLIPS, 2008) α -pineno, β -pineno, canfeno, cariofileno, sabineno, mirceno, limoneno, α -copaeno, terpinoleno, α -Terpineol, α -felandreno, α -humuleno, β -felandreno, γ -cadineno são alguns dos principais terpenos encontrados no óleo essencial dos gêneros de *Pinus*, sendo vários destes identificados na análise por GC-MS.

Tabela 19: Análise qualitativa em GC-MS da composição dos diferentes substratos em estudo, sob os diferentes métodos de extração.

Substrato	Acícula de Pinus			Cepilho de Pinus		
Compostos / Met.	Sohx.	Dic.pe.	GLP	Sohx.	Dic.pe.	GLP
α-pineno	x	x	x	x	x	x
α-fencheno			x			
β-pineno	x	x	x	x	x	x
Mirceno			x			
R-(+)-Limoneno	x	x	x	x	x	x
B-felandreno			x		x	x
Trans-sabinol					x	x
Trans-verbenol					x	x
Safranól					x	x
Verbenona					x	x
Trans-acetona		x	x			
α-Terpineol		x	x			
α-copaeno		x	x			
β-elemeno		x	x			
Trans-cariofileno	x	x	x			
α-humuleno	x	x				
α-amorfeno	x	x	x			
Δ-germacreno	x	x	x			
β-selineno		x	x			
Biciclogermacreno	x	x	x			
Hidroxitolueno-butilado						x
α-muroleno	x	x	x			
γ-cadineno	x	x	x			
Δ-amorfeno	x	x	x			
Espatulemol	x	x	x			
Óxido de cariofileno	x	x	x			
Epóxido de humuleno	x	x	x			
α-muralol	x	x	x			
α-cadinol	x	x	x			
Guaiazuleno	x	x	x			

*Dic-pe = Diclorometano/n-pentano; Sohx = Soxhlet.

A Tabela 20 mostra uma comparação qualitativa na composição dos diferentes substratos de bagaço de maçã e resíduo de laranja, em relação ao método de extração empregado. Segundo o constatado por diversos autores (DANIELSKI *et al.*, 2008; STEINBRECHER *et al.*, 1999; FISHER; PHILIPS, 2008) α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno, terpinoleno, α -Terpineol, linalol, citral, sabineno e terpinoleno, são alguns dos principais terpenóides encontrados no óleo essencial dos gêneros de *Citrus*.

Tabela 20: Análise qualitativa em GC-MS da composição dos diferentes substratos em estudo, sob os diferentes métodos de extração.

Substrato	Bagaço de Maçã			Resíduo de Laranja		
Compostos / Met.	Sohx.	Dic.pe.	GLP	Sohx.	Dic.pe.	GLP
Dimetil Sulfóxido		x				
2,2 dimetil – 1 - 1 pentanol		x				
α-pineno	x			x	x	x
β-pineno	x		x	x	x	x
Mirceno				x	x	x
Limoneno	x	x	x	x	x	x
Linalol						x
Hidrato de Trans-sabineno				x	x	
α-Terpineol				x	x	x
Trans dihidro-carvona				x	x	x

*Dic-pe = Diclorometano/n-pentano; Sohx = Soxhlet.

Observa-se que para a maioria das amostras, o método GLP com gás butano apresenta uma maior variedade de compostos, ao passo que para o bagaço de maçã o método com diclorometano/n-pentano mostrou-se mais eficaz, possivelmente devido a uma maior polaridade dos compostos obtidos.

Verificou-se com esta caracterização dos substratos que os métodos utilizados possibilitam a extração de compostos como α -Terpineol e trans-dihidro-carvona, o que justifica a utilização da extração em análises posteriores para análise de produtos da biotransformação.

4.4 ISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS

Com o objetivo de se trabalhar com micro-organismos mais adaptados / resistentes aos terpenos, foram isoladas cepas a partir de substratos terpênicos como acícula e casca de *Pinus*. Vinte e uma cepas foram isoladas com sucesso. Entre estas, duas foram classificadas como leveduras, cinco foram caracterizadas como bactéria e quatorze como fungos filamentosos. As leveduras foram nomeadas Y4a e Y4b. As bactérias receberam a nomeação de B1a, B1b, B1c, B1d e B2a. Os fungos isolados mostraram aspectos diferentes, como tempo de esporulação e coloração das colônias.

4.5 SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

De uma forma geral, a concentração inibitória mínima (MIC) de limoneno perante algumas bactérias e leveduras é inferior a 2%. Porém, alguns fungos e bactérias são capazes de suportar maiores concentrações. Em processos de biotransformação, a concentração de limoneno costuma variar de 0,2 a 1% (BICAS; PASTORE, 2007). Por esta razão a concentração de limoneno utilizada nos experimentos de seleção e teste de fonte de carbono foi de 1%. A utilização desta concentração também pode ser justificada pela quantidade de limoneno presente na casca e bagaço de laranja. Uma concentração menor que 1% não teria sentido uma vez que no substrato utilizado posteriormente para fermentação sólida a concentração de limoneno é próxima de 5,5% por grama de peso seco, não atingindo concentrações inferiores a 1% quando da adição de água para formulação do meio.

Na Tabela 21 mostra-se a relação entre o tempo para crescimento dos micro-organismos e a esporulação nos meios controles e contendo terpenos. O crescimento dos fungos do gênero *Rhizopus* foi avaliado conforme a altura do micélio no meio contendo 1% de terpeno e no meio controle. No caso das cepas isoladas (Tabela 22), observou-se maior número de cepas resistentes uma vez que as cepas foram isoladas de materiais como o *Pinus* que apresenta uma alta

concentração de α e β -pineno (LUDLEY *et al.*, 2009; KUPCINSKIENE; STIKLIENE; JDZENTIENE, 2008; LIN; OWEN; PEÑUELAS, 2007). De qualquer maneira, as cepas da coleção do laboratório também apresentaram bons resultados (Tabela 23). Contudo, estas cepas laboratoriais foram escolhidas por terem sido reportadas como produtoras de aromas (ROSSI *et al.*, 2009; CHRISTEN *et al.*, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2000; LINDMARK, 2003).

Tabela 21: Seleção dos fungos quanto a capacidade de crescer em meio contendo 1 % de terpenos.

Cepa e código	Condições do meio	Crescimento completo	Esporulação	Crescimento em relação ao controle (%)
<i>Rhizopus</i>	Branco	24h	72h	
<i>microsporus</i> (2)	α e β -Pineno	48h	120h	322,7
	Limoneno	96h	Não esporulou completamente	332,6
<i>Rhizopus</i>	Branco	24h	72h	
<i>delemar</i> (3)	α e β -Pineno	48h	72-96h	233,3
	Limoneno	Não cresceu	-----	-----
<i>Rhizopus</i>	Branco	24h	72h	
<i>oryzae</i> (4)	α e β -Pineno	72h	144h	364,3
	Limoneno	96h	Não esporulou completamente	552,4
<i>Rhizopus</i>	Branco	24h	72h	-----
<i>oligosporus</i> (5)	α e β -Pineno	72h	120h	300,0
	Limoneno	96 – 120h	168h	522,2
<i>Rhizopus</i>	Branco	24h	144h	-----
<i>circicans</i> (6)	α e β -Pineno	48h	120h	214,2
	Limoneno	72h	120h	196,0
<i>Rhizopus</i> SP (7)	Branco	24h	48h	-----
	α e β -Pineno	48h	48h	233,2
	Limoneno	72h	72h	312,5
<i>Rhizopus</i>	Branco	24h	72h	-----
<i>arrhizus</i> (8)	α e β -Pineno	Não cresceu	-----	-----
	Limoneno	72h	96h	161,5
<i>Trichoderma</i>	Branco	48h	144-168h	-----

<i>harzianum</i> (9)	α e β -Pineno	48h	96h	-----
	Limoneno	72h	168h	-----
<i>Trichoderma</i>	Branco	48h	72h	-----
<i>harzianum</i> (10)	α e β -Pineno	48h	72h	-----
	Limoneno	72h	96h	-----
<i>Rhizopus</i>	Branco	24h	168h	-----
<i>arrhizus</i> (11)	α e β -Pineno	48-72h	168h	204,6
	Limoneno	96h	144h	269,3
<i>Rhizopus</i>	Branco	24h	Não esporulou	-----
<i>oryzae</i> (12)			completamente	
	α e β -Pineno	48h	144h	173,1
	Limoneno	72-96h	Não esporulou	152,6
<i>Rhizopus</i>	Branco	24h	72h	-----
<i>delemar</i> (13)	α e β -Pineno	48h	96h	160,5
	Limoneno	72h	120h	241,9
<i>Rhizopus</i>	Branco	24h	96h	-----
<i>stolonifer</i> (14)	α e β -Pineno	48h	72h	216,7
	Limoneno	72h	120h	225
<i>Rhizopus</i>	Branco	24h	Não esporulou	-----
<i>arrhizus</i> (15)			completamente	
	α e β -Pineno	48-72h	Não esporulou	238,9
			completamente	
<i>Pichia stipitis</i> (16)	Limoneno	72h	Não esporulou	219,3
			completamente	
<i>Kluyveromyces</i>	Branco	24h	-----	-----
<i>Marxianus</i> (17)	α e β -Pineno	Não cresceu	-----	-----
	Limoneno	Não cresceu	-----	-----
<i>Pachysolen</i>	Branco	24h	-----	-----
<i>tannophylus</i> (18)	α e β -Pineno	Não cresceu	-----	-----
	Limoneno	Não cresceu	-----	-----
<i>Ceratocystis</i>	Branco	48h	-----	-----
<i>fimbriata</i> (19)	α e β -Pineno	96-120h	-----	-----
	Limoneno	120-144h	-----	-----

<i>Rhizopus</i>	Branco	24048h	96-120h	-----
<i>formosa</i> (20)	α e β -Pineno	48-72h	120h	214,1
	Limoneno	96-120h	144h	201,9

Tabela 22: Seleção de micro-organismos isolados em relação ao crescimento.

Cepa/Terpeno	Limoneno	α e β -pineno
1a	+	+
1b	-	+
1c	-	-
2a	+	+
2b	+	+
2c	+	+
2d	+	+
3a	+	+
3b	+	+
3a	+	+
4a	+	+
4b	-	-
4c	+	+
4d	+	+
Y4a	-	-
Y4b	+	+
B1a	+	+
B1b	+	+
B1c	-	-
B1d	+	+
B2a	-	-

“+” representa crescimento positivo e “-” significa negativo

Tabela 23: Seleção de cepas do laboratório em relação ao crescimento.

Cepa	Limoneno	α e β -pineno
2	+	+
3	-	-
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	-	+
8	-	-
9	-	-
10	+	+
11	-	-
12	+	-
13	+	+
14	-	+
15	+	+
16	+	+
17	-	+

18	-	-
19	+	+
20	+	+

“+” representa crescimento positivo e “-” significa negativo.

Apesar de apresentarem crescimento nos meios contendo os terpenos testados, as cepas estudadas, em geral, necessitaram de 24 horas a mais para crescerem nos meios contendo α e β -pineno quando comparadas ao meio controle. Com relação ao limoneno, o tempo para que as cepas se desenvolvessem foi superior a 48 horas, em relação ao meio controle e 24 horas superior ao tempo necessário para crescer nos meios contendo α e β -pineno. Em adição, muitas delas também necessitaram de mais tempo para esporular (2, 4, 5, 6, 10, 13) o que indica que a presença dos terpenos não tornou o meio menos propício ao crescimento, mas levou a uma fase lag mais longa.

Martins *et al.*, (2005) apontam a importância e comparam o desenvolvimento de fungos em diferentes meios de cultivo, uma vez que os fungos reagem de maneiras diferentes aos estímulos induzidos pela composição do meio. Ademais, é possível inferir a importância dos resultados obtidos a partir da observação do comportamento dos micro-organismos durante a seleção. Sendo assim, as cepas que esporularam mais rapidamente na presença dos terpenos foram consideradas afetadas negativamente e conseqüentemente não foram selecionadas para etapas posteriores, pois atingiram seu estado de resistência mais rapidamente e conseqüentemente estão menos adaptadas aquele meio.

As diferentes cepas de *Rhizopus* apresentaram resultados interessantes uma vez que a altura do micélio variou de forma significativa quando comparado as amostras controle, variando de 152,6% (cepa 12) a 552,4% (cepa 4) na presença de limoneno (Figura 5). Na presença de α e β -pineno (Figura 6) a altura do micélio não cresceu tanto quanto na presença de limoneno. Entretanto, a altura do micélio chegou a 364.3% (cepa 4).

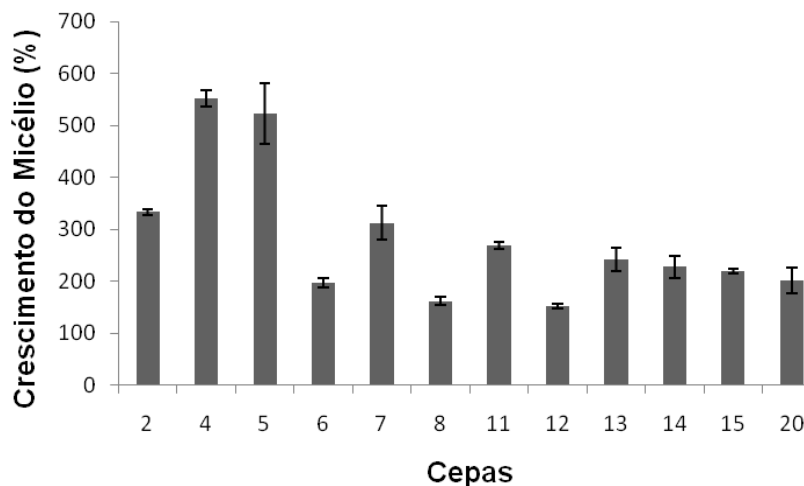


Figura 5: Crescimento da altura do micélio de *Rhizopus* na presença do limoneno a 1% em comparação com o meio controle após 7 dias de cultivo (%).

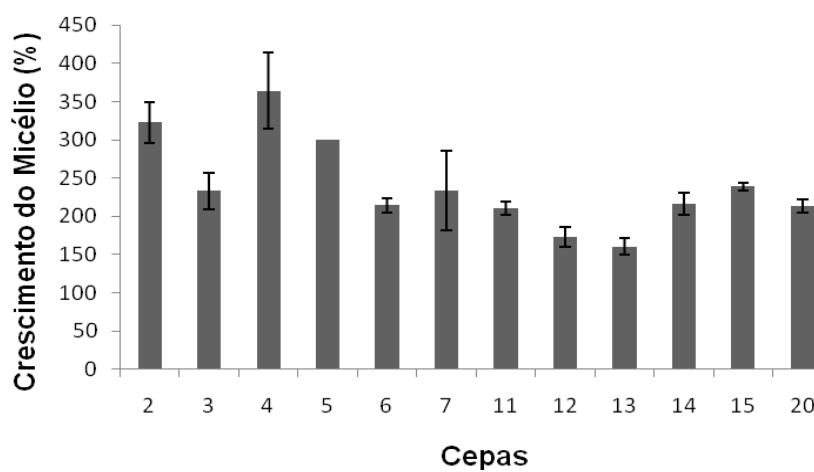


Figura 6: Crescimento da altura do micélio de *Rhizopus* na presença de 1% de α e β -pineno em comparação com o meio controle após 7 dias de cultivo (%).

Como constatado por Bicas e Pastore (2007) a resistência ao substrato não garante uma alta atividade de biotransformação, entretanto, é uma característica essencial a um agente da biotransformação. Desta maneira, esta etapa é uma importante parte do estudo.

As cepas que mais se destacaram nesta etapa foram as cepas 2, 4 e 5 de *Rhizopus*, respectivamente *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus oligosporus*. Dentre as cepas isoladas, todas consideradas resistentes a limoneno,

α -pineno e β -pineno foram testadas posteriormente, assim como as leveduras selecionadas.

4.6 TESTE DE FONTE DE CARBONO

Para encontrar um micro-organismo capaz de biotransformar certo substrato, é necessário verificar a resposta do micro-organismo a ele. O primeiro passo é a seleção daqueles micro-organismos resistentes que são capazes de utilizar o substrato como fonte de carbono (BICAS *et al.*, 2009). Isto indica a existência de uma rota metabólica capaz de degradar o substrato, a qual pode levar ao acúmulo de produtos intermediários interessantes.

No meio contendo limoneno como fonte exclusiva de carbono, as melhores concentrações de biomassa (Figura 7) foram obtidas pelas cepas isoladas 4d (crescimento de 1g/L), 4a (0.95g/L), 2b (0,81g/L), assim como as leveduras 16 (1.05g/L - *Pichia*) e Y4b (0,86g/L), e 5 (0.78g/L - *Rhizopus*). Posteriormente, as cepas 2c (0.72g/L), 4c (0.74g/L) e 3a (0.63g/L) também foram testadas na seleção de produtos em etapas posteriores. Para o teste de fonte carbono com α -e β -pineno os melhores resultados (Figura 8) foram obtidos com as linhagens 16 (1.14g / L), Y4b (0.89g / L), 4a (0.81g / L), 5 (0,90 g / L) e 19 (0.92g / L). Neste teste, melhores resultados foram obtidos em meio mineral contendo α -pineno e β , pois as cepas apresentaram maior crescimento. Como as cepas foram isoladas de resíduos de *Pinus* isto pode ser facilmente explicado devido a presença de terpenos em seu substrato natural.

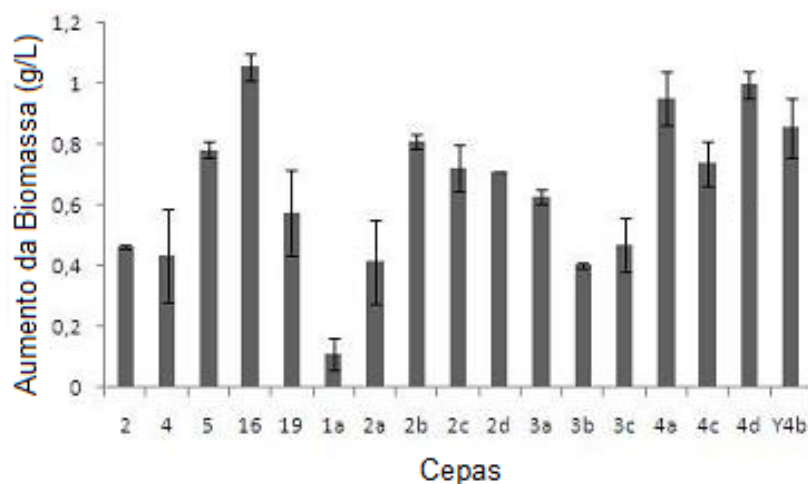


Figura 7: Concentração de biomassa obtida usando limoneno como fonte de carbono (1% v/v).

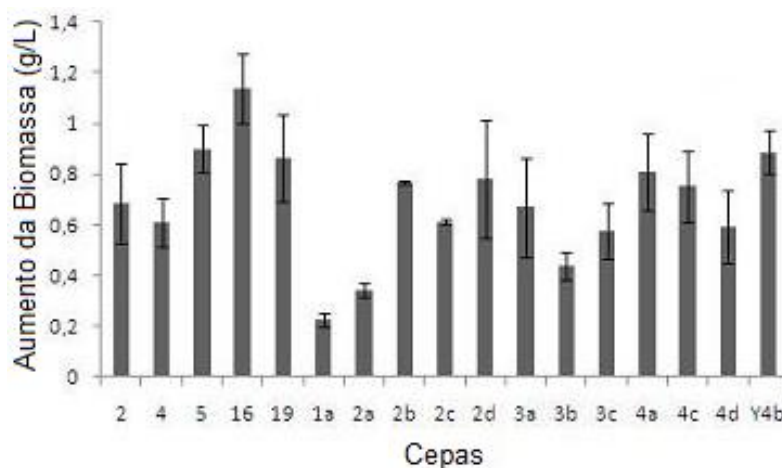


Figura 8: Concentração de biomassa obtida usando α - e β -pineno como fonte de carbono (1% v/v).

4.7 FERMENTAÇÃO SUBMERSA - SCREENING

As dez melhores cepas nas etapas anteriores de resistência e teste de fonte de carbono foram testadas quanto a sua capacidade de biotransformação do limoneno, α -pineno e β -pineno. Nenhuma delas mostrou-se capaz de biotransformar α -pineno, enquanto apenas a levedura isolada Y4b apresentou produtos para a fermentação do meio contendo β -pineno (tabela 24). Em análises diárias do headspace dos fermentados, apenas quatro cepas mostraram capacidade de biotransformar o limoneno.

Uma vez que as quatro cepas foram testadas quanto a biotransformação, não era possível saber quais compostos derivados de limoneno poderiam ser encontrados, pois não se sabia quais rotas metabólicas o limoneno tomaria, dificultando a identificação dos produtos.

Tabela 24: Produtos identificados por GC-MS no meio fermentando das cepas selecionadas. Lin significa limoneno e β -pin significa β -pineno.

Composto/Micro-organismo e meio	Índice de retenção linear experimental	Índice de retenção linear literatura	<i>Rhizopus</i> (5) 1%Lin	<i>Pichia</i> 1% Lin	3a 1% Lin	Y4b 1% Lin	Y4b 1% β -pin
α -fencheno	951	954					X
Sabineno	973	975				X	X
Hidrato de trans-sabineno	1100	1098				X	
Trans-p-menta-2,8 dien-1ol	1124	1122	X	X	X	X	
Cis-p-menta-2,8 dien-1ol	1139	1137	X	X	X	X	
3-metil-2-puril-acroleína	1167	1172		X			
Isômero de carveol	1197		X	X	X		
Dihidrocarveol	1197	1193		X		X	
Trans-Carveol	1217	1216	X		X	X	
Cis-Carveol	1230	1229	X	X	X	X	
Carvona	1243	1243	X	X	X		
Acetato de hidrato de trans-sabineno	1249	1256		X		X	
Óxido de Cis-carvona	1267	1263		X			
Aldeído Perílico	1267	1269		X			
Limoneno-1,2-diol	*	*	X		X		
Álcool Perílico	1297	1295	X	X			
Guaiol	1597	1560				X	X

* = Tentativa de identificação

A maioria dos produtos da fermentação foi identificada comparando-se os índices de retenção linear da amostra ao da literatura (ADAMS, 2007) em adição a biblioteca NIST para comparação dos espectros. Os compostos que constam como tentativa de identificação, entretanto, não possuíam seus índices de retenção linear na literatura para as condições de análise usadas, não permitindo a confirmação da identificação.

É possível que o limoneno também seja metabolizado pela cepa para a

produção de biomassa ou para outras finalidades. Uma vez que os bioaromas são produzidos no metabolismo secundário (Longo e Sanróman, 2006), não haverá produção de bioaromas se o limoneno for incorporado pelo micro-organismo durante o metabolismo primário. Uma alternativa para evitar o consumo precoce do limoneno seria adicioná-lo ao meio durante a fase estacionária do crescimento microbiano.

Apesar das cepas de origem laboratorial terem sido escolhidas por já terem sido reportadas como produtoras de aromas, a maioria não demonstrou capacidade de biotransformar o limoneno. Ou seja, estas cepas que possuem potencial para biossíntese de compostos de aroma não apresentaram potencial para bioconversão de limoneno. Das cepas laboratoriais apenas *Pichia stipitis* e *Rhizopus* 5 tiveram continuidade na fermentação submersa mas, nenhuma delas foi utilizada para biotransformação em estado sólido devido a ausência de compostos nos estudos preliminares de biotransformação em estado sólido na análise de seus *headspaces*.

As análises diárias do fermentado das leveduras *Pichia stipitis* e Y4b denotaram a redução da concentração do limoneno no meio fermentativo (Figura 9). O consumo mais rápido do limoneno no meio fermentado pela levedura isolada é evidente. A redução da concentração de limoneno deve-se a utilização de compostos para a biotransformação, além da provável perda por evaporação no decorrer do processo, como constatado por Demyttenaere, Belleghem e Kimpe (2001).

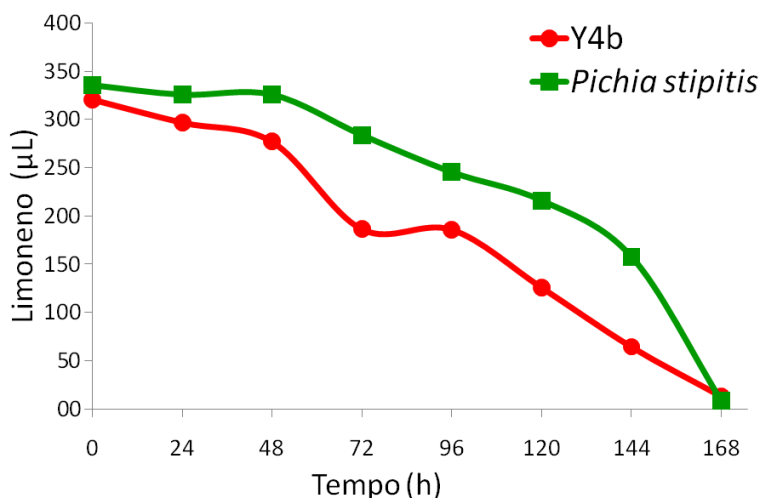


Figura 9: Concentração de limoneno ao longo do processo fermentativo das leveduras *P. stipitis* e Y4b em meio mineral contendo inicialmente 1% de limoneno.

Quando comparadas às análises de *headspace* dos fermentados, as análises dos extratos em hexano resultaram em concentrações muito maiores dos produtos, demonstrando a falta de sensibilidade do método de headspace (Tabela 25). As extrações foram realizadas após o quinto dia de fermentação para as leveduras *Pichia stipitis* e a isolada Y4b e no sétimo dia para o fungo filamento *Rhizopus* 5 e o isolado 3a. As análises foram realizadas nestes tempos de fermentação, uma vez que em análises anteriores, neste tempo de fermentação observavam-se as maiores concentrações de compostos voláteis headspace. Para a levedura isolada Y4b e o fungo *Rhizopus* 5 concentrações relevantes de produto não foram encontradas. Em destaque está a produção de carvona pelo fungo isolado 3a.

Tabela 25: Principais produtos detectados na fermentação submersa, em meio contendo limoneno, após extração.

Micro-organismo	Composto	Concentração µL / L
<i>Pichia stipitis</i>	Trans-p-menta-2,8 dien-1ol	17,30
	Cis-p-menta-2,8 dien-1ol	5,55
	Trans-carveol	24,00
	Cis-carveol	14,50
	Carvona	37,30
Isolado 3a	Trans-p-menta-2,8 dien-1ol	90,70
	Cis-p-menta-2,8 dien-1ol	37,40
	Trans-carveol	132,10
	Cis-carveol	50,09

Carvona	245,10
Limoneno-1,2-diol	73,80

Quatro cepas apresentaram capacidade de biotransformação de limoneno: Y4b, 3a, *Pichia Stipitis* e *Rhizopus oligosporus* 5. Dezesete compostos foram identificados (Tabela 24), entre eles carveol, álcool perílico carvona e aldeído perílico se destacam, que são compostos de aroma que possuem algum interesse comercial. Carvona tem grande importância como fragrância e *flavor*, de relevância na área médica e outras aplicações. Assim, como a carvona, o álcool perílico é um composto derivado de limoneno com maior valor. Sua importância com relação ao câncer está se tornando difundida. Carveol e seus isômeros, assim como dihidrocarveol e óxido de carvona são da via metabólica da carvona, da mesma maneira que o aldeído perílico está na rota metabólica do álcool perílico, conforme demonstrado por Maróstica Júnior e Pastore (2007b).

Produção de carvona utilizando limoneno como precursor já havia sido relatada em alguns estudos (CARVALHO; FONSECA, 2003; VANEK; VALTEROVA; VALSAR, 1999), como a produção de álcool perílico (OLIVEIRA; STRAPASSON, 2000; MENENDEZ *et al.*, 2002). A maioria dos trabalhos quantifica a produção de carvona apenas em relação ao rendimento, alguns atingem alto rendimento, acima de 90%. Na presente pesquisa o rendimento obtido não foi elevado, estando próximo a 7%. Justifica-se esta diferença uma vez que a quantidade utilizada de limoneno (400 µL – 1%) foi bastante superior a quantidade utilizada nos demais estudos, pois não fazia sentido trabalhar com uma concentração inferior a 1% sendo que o resíduo de laranja utilizada para fermentação sólida possui 5,36% de limoneno em base semi-seca. Vanek, Valterov e Valsar (1999) obtiveram uma quantidade de 24 mg de carvona, porém, não é possível comparar com nosso caso, uma vez que este resultado foi obtido em uma escala muito maior, onde era usado 120 mg de limoneno, ao passo que na presente pesquisa foi utilizado 400 µL, todavia, com rendimento inferior.

Quanto ao limoneno-diol, outro composto obtido em concentrações interessantes, pode-se afirmar que o rendimento obtido foi baixo, porém poucos

trabalhos tiveram como objetivo a produção de limoneno-diol. Mukherjee, Kraidman e Hill (1973) relataram a obtenção de 1,5 g/L de limoneno-diol, obteve-se a concentração de 73,80 μ L/L. Deve-se ressaltar, entretanto, que a fermentação submersa não era o objetivo do trabalho e que a produção destes compostos não foi otimizada nesta etapa.

Alguns dos produtos encontrados no meio de fermentação, não foram descritos como derivados do limoneno ou β -pineno, assim sua presença não pode ser atribuída a efeitos de biotransformação. A presença de sabineno, guaiol, α -fencheno e derivados no meio fermentado pela levedura isolada Y4b pode ser investigada em futuras pesquisas.

Como já citado anteriormente, os terpenos possuem uma baixa solubilidade em água, isto levou alguns autores a utilizar duas fases diferentes para a fermentação, uma orgânica contendo o terpeno em estudo e outra inorgânica, aquosa (MIRATA; HEERD; SCHRADER, 2009; CARVALHO; FONSECA, 2006; SCHEWE *et al.*, 2006).

De acordo com Carvalho e Fonseca (2006) o uso de uma fase orgânica no sistema aquoso de reação aumenta a biotransformação enzimática e microbiana se comparado ao uso em um sistema puramente aquoso. Entretanto, presente estudo, isto não foi explorado, uma vez que a etapa de fermentação submersa se tratava de uma etapa de screening para a fermentação em estado sólido e não era o objetivo da pesquisa.

4.8 TESTE DE INÓCULO

4.8.1 Primeiro teste do inóculo

Os três inóculos testados no primeiro momento apresentaram características muito semelhantes (figura 10). O inóculo proveniente da suspensão apresentou uma fase lag maior, como esperado, consumindo menos açúcar nas primeiras 48 horas de fermentação. Entretanto, após 96 horas a concentração de açúcar de todas as fermentações tornou-se próxima.

Supôs-se que os inóculos PDA e da casca da laranja teriam um desenvolvimento mais rápido e uma concentração final de açúcar menor, uma vez que deveriam estar mais adaptados por já terem crescido na presença do limoneno. Contudo, ao final do teste verificou-se que o tipo de inóculo não tinha influência significativa na concentração de açúcar ao longo da fermentação. Por este motivo decidiu-se optar pelo inóculo de suspensão, pois prepará-lo tornou-se mais simples.

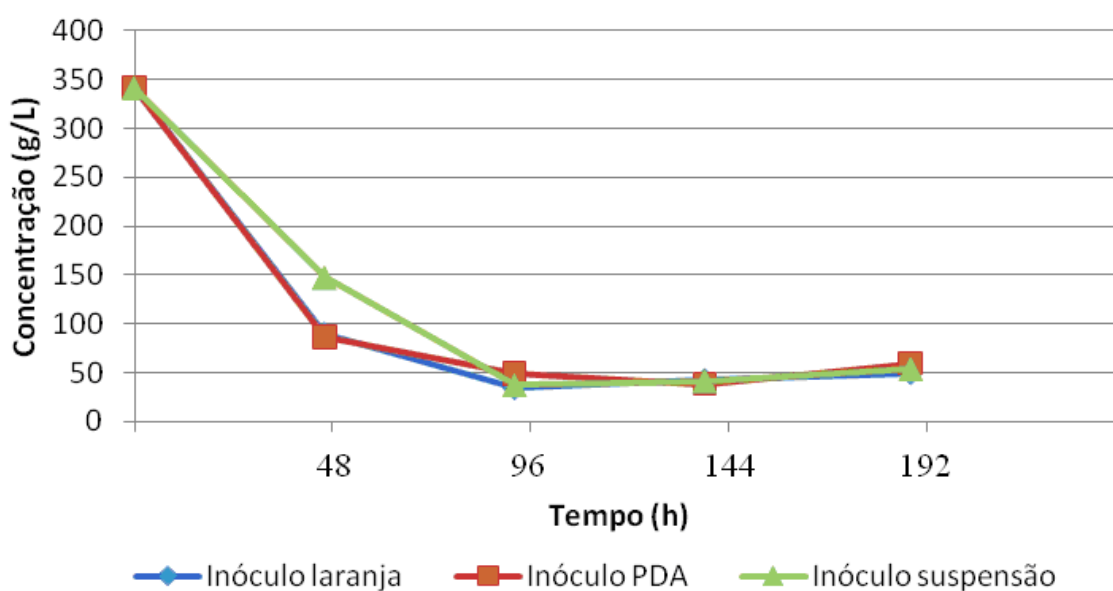


Figura 10: Cinética de açúcares para o teste de seleção do inóculo.

4.8.2 Segundo teste do inóculo

Após algumas fermentações, chegando na etapa de otimização da fermentação e teste das variáveis para análise estatística o micro-organismo isolado 3a (figura 11) deixou de crescer da maneira que havia se observado anteriormente. Por este motivo, um novo teste de inóculo foi realizado, desta vez, simplificado, de caráter meramente visual.

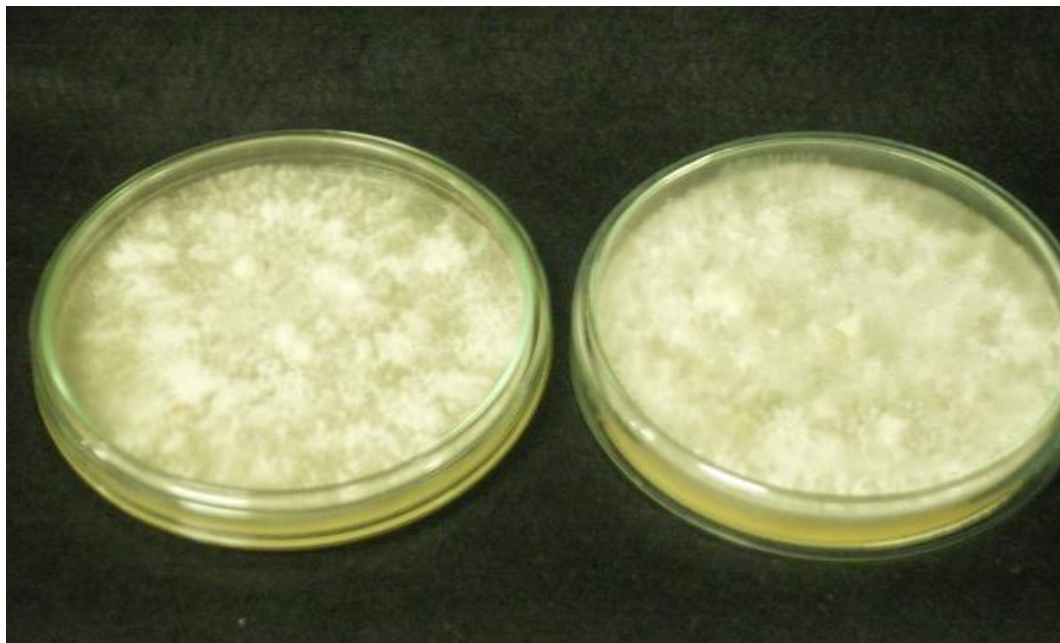


Figura 11: Aspecto do fungo isolado 3a após 7 dias de cultivo em PDA.

Como resultado do teste observou-se a capacidade dos micro-organismos começarem a se propagar pelo meio de cultivo após 24h de fermentação no inóculo desenvolvido, posterior ao crescimento em resíduo de laranja e no inóculo na forma de *pellets*, cultivados em uma solução aquosa de bagaço de laranja. No caso dos inóculos em forma de suspensão, o que obteve maior crescimento foi o de 5 dias de crescimento, apresentando um atraso de 24 horas em relação aos da suspensão crescida em PDA normal. Com 48 horas os inóculos do resíduo da laranja e solução aquosa de laranja haviam tomado todo o meio de cultivo. Devido a maior facilidade de preparo o inóculo do extrato aquoso de laranja foi o utilizado para as etapas de planejamento experimental e verificação das variáveis da fermentação. A figura 12 ilustra o teste de inóculos após 4 dias de crescimento. Apesar da suspensão em PDA, aparentar bom crescimento no substrato em relação aos demais, seu desenvolvimento no meio começou posteriormente ao inóculo de *pellets* e ao do resíduo da laranja.



Figura 12: Cultivo do fungo isolado 3a em resíduo de laranja. Da esquerda para a direita – Inoculo do resíduo da laranja, inóculo a partir da suspensão aquosa de PDA de 5 dias, inoculo de *pellets*, suspensão aquosa de PDA de 6 e 7 dias de crescimento.

4.9 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

4.9.1 Teste de substrato

O resíduo de laranja foi selecionado para biotransformação do limoneno devido à alta concentração deste terpeno no substrato seco (aproximadamente 5%), além de uma pureza elevada quando comparada a existência de outros terpenos (aproximadamente 96%) como citado em itens anteriores.

A existência de concentrações muito ínfimas de terpenos nos outros substratos testados impossibilitou que fossem utilizados para fermentação, principalmente se considerada uma grande heterogeneidade de terpenos, o que inviabilizaria a compreensão das rotas metabólicas que por ventura ocorressem na fermentação.

Apesar da baixíssima concentração de terpenos, o bagaço de maçã foi testado para fermentação como substrato suporte misturado ao resíduo da laranja, uma vez que a concentrações de açúcares do bagaço de maçã era altíssima.

Todavia, apesar de proporcionar um bom crescimento aos micro-organismos, não se notou diferença com relação ao crescimento no substrato composto apenas por resíduo da laranja. A utilização do bagaço de maçã poderia ter sido também uma alternativa, caso houvesse um teor exagerado de limoneno no meio fermentativo.

Apesar de tudo, quanto aos resultados obtidos em cromatografia gasosa, não se notou uma diferença positiva quando utilizado o bagaço de maçã misturado ao fermentado, sem alterações positiva nas concentrações de produtos. Por estes motivos decidiu-se realizar as fermentações apenas com resíduo da laranja.

4.9.2 Utilização de resíduo da laranja para fermentação no estado sólido

Alguns trabalhos citam a utilização de resíduos agroindustriais para biotransformação de limoneno (MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007; BADEE; HELMY; MORSY, 2011) além de outros resíduos na composição do meio, tais como terebentina e resíduo líquido do processamento da laranja para biotransformação (MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007). Todavia, estes são resíduos líquidos e são utilizados para fermentação submersa.

Para que o óleo essencial de laranja, que é altamente rico em limoneno, como visto em etapas anteriores, possa ser obtido é necessário que este seja extraído. Contudo, a partir do momento em que este óleo é extraído na indústria ele obtém valor comercial e passa a ter potencial para comercialização, deixando, para muitas indústrias, de ser um resíduo. Entretanto, há ainda indústrias e pequenas empresas em que o bagaço de laranja é totalmente descartado, tornando-se verdadeiramente um resíduo que não terá um destino nobre, mas que se acumulará no meio ambiente.

Além disto, como já citado, há diversas vantagens na fermentação em estado sólido com relação à submersa, o que dá a fermentação em estado sólido um grande potencial nesta área, ainda não explorada, ou explorada sem sucesso.

4.9.3 Planejamento experimental

Um primeiro planejamento experimental foi realizado para estudar os efeitos

das variáveis pH, umidade, taxa de inóculo e granulometria. Entretanto, ocorreu que a maioria dos frascos fermentados não apresentou crescimento do fungo, desenvolvendo-se apenas aqueles onde a umidade era de 80%.

Dois fatores podem ter levado ao não crescimento do fungo, a incapacidade dele em crescer a baixos teores de umidade, uma vez que ele havia sido testado em fermentação submersa ou a incapacidade de crescer nos substratos que possuíam uma maior concentração de limoneno, uma vez que a seleção ocorreu a 1% de concentração.

A 60% de umidade a concentração aproximada de limoneno era de 2,7%, a 70% era de aproximadamente 1,88% e a 80% era de aproximadamente 1,07% de limoneno. Por este motivo é possível que não só a umidade do meio, mas uma concentração superior a 1% de limoneno com as umidades mais baixas tenha impedido o crescimento do micro-organismo isolado 3a. Assim, um novo planejamento foi realizado mantendo a variável umidade fixa em 80%.

A tabela 26 mostra os compostos identificados por GC-MS na fermentação em estado sólido que ocorreu a 30°C de temperatura, 80% de umidade, com pH, granulometria e taxa de inóculo variável de acordo com o planejamento experimental.

Tabela 26: Principais terpenóides e outros compostos identificados por GC-MS em fermentação em estado sólido do resíduo da laranja com a cepa isolada 3a.

Composto	Índice de retenção literatura	Índice de retenção amostra
β-pineno	974	978
Mirceno	988	987
Limoneno	1024	1026
Cis-β-Terpineol	1144	1144
Neo iso pulegol	1171	1171
4-Terpineol	1177	1176
α-Terpineol	1188	1190
Dihidrocarveol	1153	1193
4-etil-guaiacol	*	*
p-vinil-guaiacol	1309	1304
Limoneno-diol	*	*
Isômero limoneno-diol	*	*
Epóxido de limoneno	*	*
Álcoois	x	x
Ésteres	x	x

*= tentativa de identificação; x=álcoois e ésteres por não serem compostos de interesse na

fermentação foram agrupadas na tabela.

Assim como na fermentação submersa, a maioria dos produtos da fermentação foi identificada comparando-se os índices de retenção linear da amostra ao da literatura (ADAMS, 2007) em adição a biblioteca NIST para comparação dos espectros. Os compostos que constam como tentativa de identificação, entretanto, não possuíam seus índices de retenção linear na literatura para as condições de análise usadas, não permitindo a confirmação da identificação. O limoneno-1,2-diol, composto de interesse da fermentação e seus derivados não constavam na literatura para confirmação do índice de retenção linear. Porém, o limoneno-1,2-diol foi identificado em todas as análises das fermentações em estado sólido, assim como na fermentação submersa, além de ser conhecido como um derivado do limoneno, reduzindo as chances de erro na identificação deste terpenóide.

Como já citado anteriormente na etapa de fermentação submersa, há muitos produtos originários da fermentação, porém poucos são descritos como derivados do limoneno. Entre eles estariam o limoneno-diol, epóxido de limoneno cis- β -Terpineol, 4-Terpineol, α -Terpineol e dihidrocarveol.

4.9.3.1 Produtos formados

Na fermentação em estado sólido os principais produtos identificados e quantificados foram α -Terpineol, trans-carveol, cis-carveol e limoneno-diol. Ésteres, alcoóis e ácidos também foram encontrados, mas seus aparecimentos na fermentação não podem ser atribuídos a biotransformação do limoneno, pois não há relato da produção destes compostos a partir deste monoterpene. Na tabela 27 observa-se as concentrações obtidas dos produtos da biotransformação do limoneno nos diferentes ensaios.

Tabela 27: Concentrações obtidas dos produtos da biotransformação do limoneno nos diferentes ensaios.

Produto	Ensaio 1	E2	E3	E4	E5	E6
α -Terpineol	34,32	122,64	110,86	73,52	299,94	411,48
Trans-carveol	76,00	132,16	116,32	65,08	60,45	81,53
Cis-carveol	97,97	205,06	132,21	131,05	136,80	151,24
Limoneno-diol	2370,17	3320,46	563,20	971,57	819,94	812,26
Produto	E7	E8	E9	E10	E11	
α -Terpineol	218,36	328,55	73,72	119,50	131,97	
Trans-carveol	69,87	84,67	65,97	68,19	73,40	
Cis-carveol	88,32	116,35	83,52	74,44	77,62	
Limoneno-diol	776,32	937,88	510,43	149,81	121,878	

Resultados expressos em μg / g de substrato.

Destacam-se neste momento os ensaios 1 e 2, os quais apresentaram uma quantidade significativa de limoneno-diol. Ambos apresentavam as condições pH 6,0 e granulometria acima de 2,0 mm. Há trabalhos publicados relatando a produção de limoneno-diol, como o estudo de Carvalho *et al.*, (2000) que relata limoneno-1,2-epóxido como precursor, já Lindmark-Henriksson (2003) relata a produção de limoneno-1,2-epóxido, intermediário da rota metabólica do limoneno-diol, como produto final. Contudo, não foi encontrado relatos de obtenção de limoneno-1,2-diol por fermentação em estado sólido até o presente trabalho. A maior concentração de limoneno-diol já relatada é de 1,5 g/L (MUKHERJEE; KRAIDMAN; HILL, 1973), sendo que no presente estudo foi obtida uma concentração de 3,32 g/Kg de substrato (resíduo da laranja a 14,2% de umidade), um resultado bastante produtivo.

Quanto ao α -Terpineol destaca-se a formação deste composto durante a fermentação. Porém, há registrado na fermentação submersa uma concentração obtida de 3,2 g/L de α -Terpineol (TAN; DAY; CADWALLADER, 1998) ao passo

que neste estudo por fermentação no estado sólido foi obtida uma concentração de 0,41 g/Kg de substrato (resíduo da laranja a 14,2% de umidade). É importante ressaltar que apesar da baixa concentração obtida, não há estudos anteriores de produção deste composto com a utilização de resíduo, nem por fermentação em estado sólido, afirmação também válida aos demais compostos produzidos.

4.9.3.2 Análise estatística

A figura 13 mostra a comparação entre as diferentes concentrações finais de limoneno após 7 dias de fermentação.

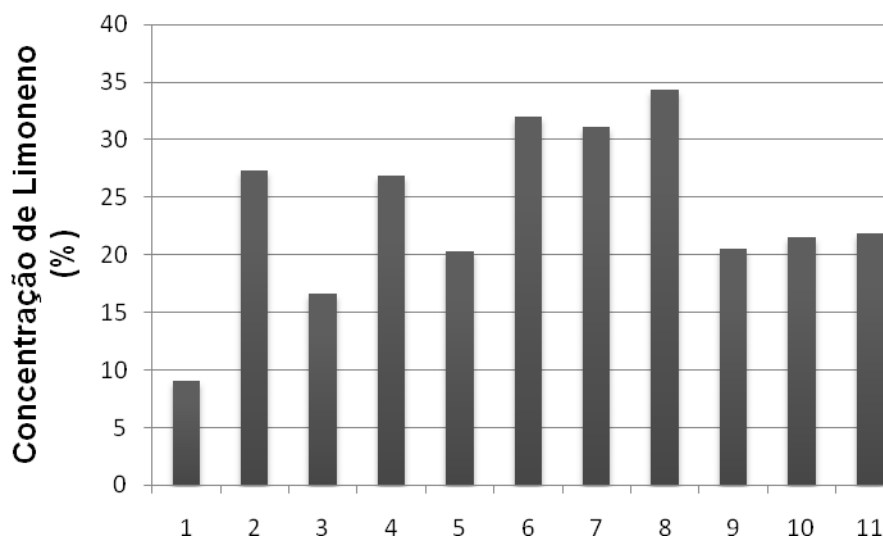


Figura 13: Concentrações finais de limoneno nos distintos ensaios após 7 dias de fermentação.

Nota-se no gráfico da Figura 12 que os ensaios 1 e 3 possuem as concentrações mais baixas de limoneno e os ensaios 6, 7 e 8, as concentrações mais altas. Os ensaios 1 e 3 foram realizados num pH maior e numa maior taxa de inóculo, ao passo que nos ensaios 6, 7 e 8, o pH era mais ácido.

A figura 14 mostra o Diagrama de Pareto analisando o efeito das variáveis no consumo de limoneno pelo micro-organismo.

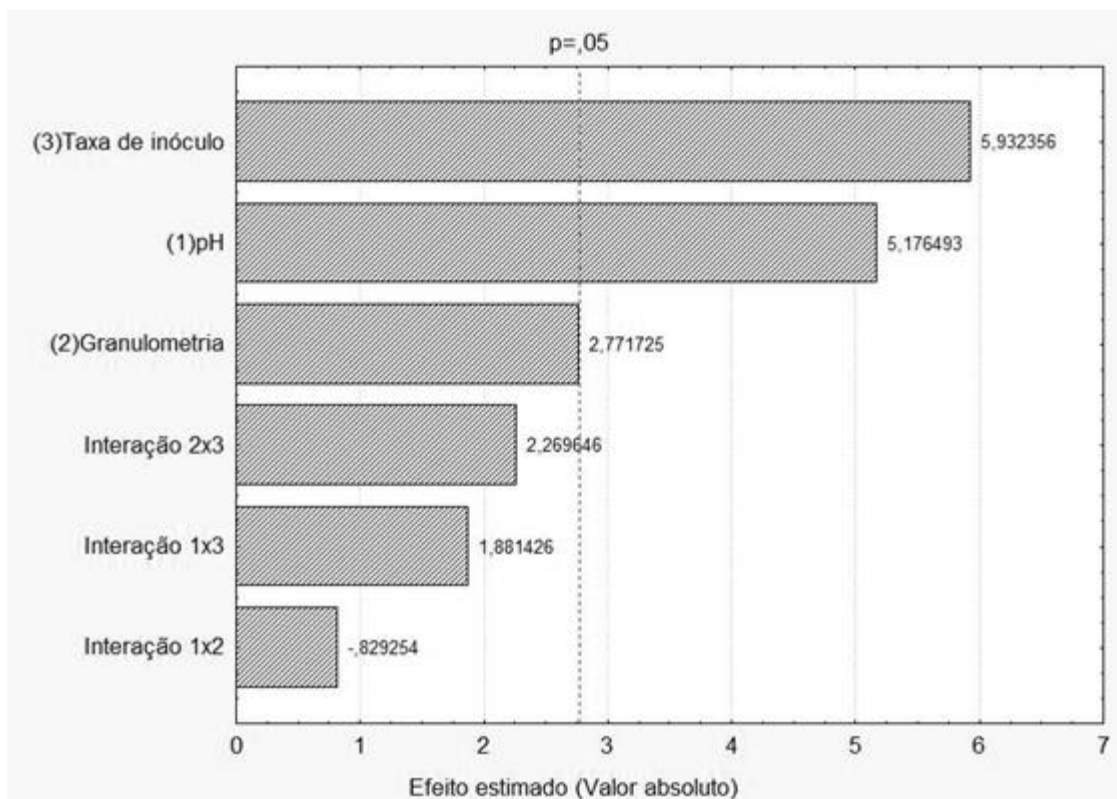


Figura 14: Diagrama de Pareto – Consumo de limoneno ao final da fermentação

Analisando-se o Diagrama de Pareto observa-se uma influência positiva das variáveis volume de inóculo (6,0 mL) e pH (6,0), ao passo que a granulometria e as interações entre granulometria e taxa de inóculo, pH e taxa de inóculo e pH com granulometria, pouca influencia tiveram na resposta.

A figura 15 mostra o Diagrama de Pareto analisando o efeito das variáveis na produção de α -Terpineol pelo micro-organismo 3a.

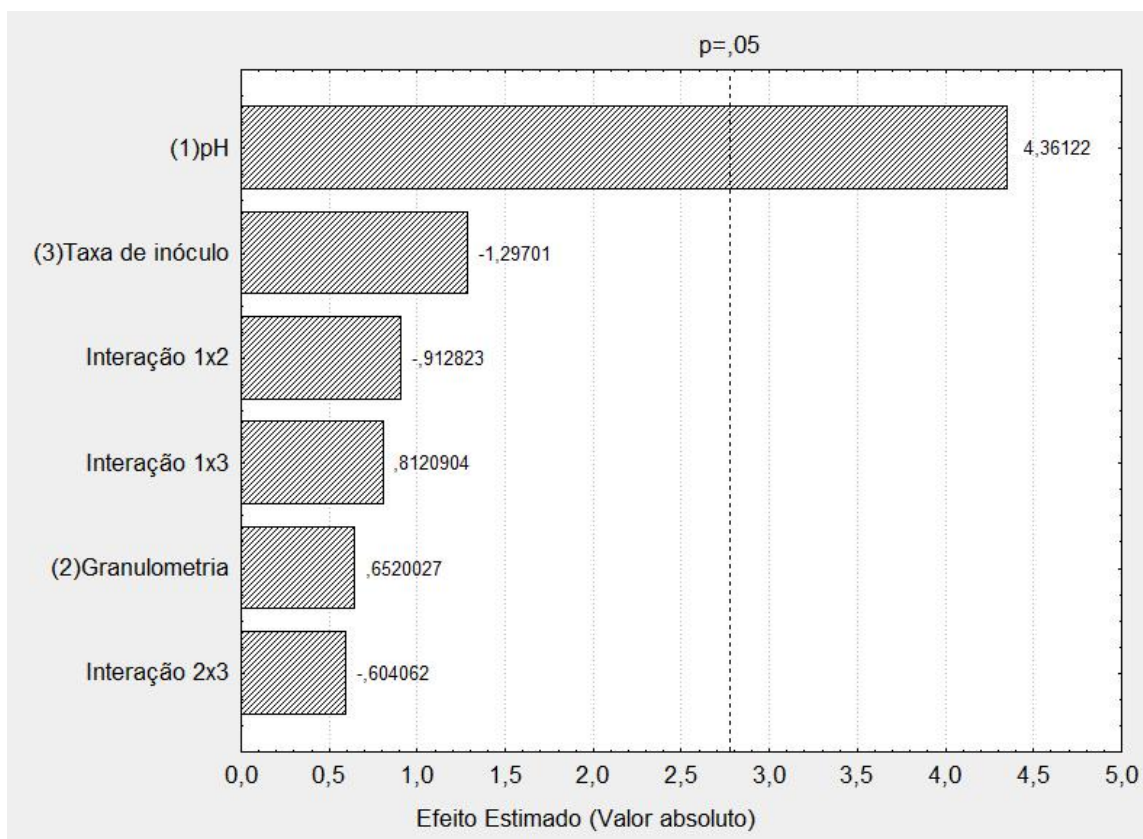


Figura 15: Diagrama de Pareto – Concentração final de α -Terpineol após 7 dias de fermentação.

Analisando-se o Diagrama de Pareto observa-se uma influência negativa da variável pH na produção de α -Terpineol, o aumento no valor do pH, diminui a produção do composto. As demais variáveis parecem não ter interferência significativa na biotransformação do limoneno em α -Terpineol. Se observados os pH constatados como mais apropriados para os estudos de Maróstica Júnior e Pastore (2007a) e Tan, Day e Cadwallader (1998) observa-se uma grande variação do pH ótimo de acordo com o micro-organismo estudado, o que sugere que diferentes enzimas devem catalisar esta mesma reação em diferentes micro-organismos.

Estabelecendo-se uma comparação entre o que fora verificado para o consumo de limoneno e a concentração obtida de α -Terpineol, nota-se que não há uma relação direta entre ambos, de forma que o consumo de limoneno pelo micro-organismo foi maior, porém, não sendo eficiente para biotransformação, já que não foi convertido em α -Terpineol. Entretanto, foi observada uma relação entre a

produção de limoneno-1,2 -diol e o consumo de limoneno. Desta maneira, é possível afirmar que maior consumo de limoneno, nas condições de pH 6,0 e taxa de inóculo de 6,0 mL, há um favorecimento da produção de limoneno-1,2 -diol que foi diretamente proporcional ao consumo do limoneno.

As tabelas 28 e 29 mostram as Tabelas de ANOVA do planejamento experimental para concentração final de limoneno e concentração de α -Terpineol, respectivamente.

Tabela 28: Tabela de ANOVA do consumo de limoneno.

ANOVA; Var.: LIMONENO; R-sqr=,83891; Adj:,76987					
3 Factor Screening Design; MS Residual=12,69533					
DV: LIMONENO					
	SS	df	MS	F	p
(1)pH	177,9913	1	177,9912781	14,02022087	0,007221362
(2)GRAN	51,03025	1	51,03025313	4,019609428	0,085003254
(3)INÓCULO	233,7663	1	233,7662531	18,41356798	0,003605797
Error	88,86728	7	12,69532626		
Total SS	551,6551	10			

Tabela 29: Tabela de ANOVA da produção de α -Terpineol

ANOVA; Var.: TERPI; R-sqr=,85177; Adj:,62943					
2**(3-0) design; MS Residual=5526,151					
DV: TERPI					
	SS	df	MS	F	p
(1)pH	105108,8	1	105108,8	19,02026	0,012051
(2)GRAN	2349,209	1	2349,209	0,425108	0,549967
(3)TX_INOC	9296,343	1	9296,343	1,682246	0,264381
1 by 2	4604,641	1	4604,641	0,833246	0,412977
1 by 3	3644,445	1	3644,445	0,659491	0,462303
2 by 3	2016,443	1	2016,443	0,364891	0,578389
Error	22104,6	4	5526,151		
Total SS	149124,5	10			

Observa-se nas tabelas acima um bom valor de R^2 para ambas as análises estatísticas, valores de 0,84 e 0,85. Estatisticamente, estes resultados foram considerados como resultados confiáveis por possuírem valores de R^2 acima de 0,70.

4.10 CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Um experimento de fermentação em estado sólido na condição de 30 °C, 80% de umidade, granulometria entre 2 mm e 3 mm e taxa de inóculo de 6 mL foi realizado e a cinética de diferentes fatores do processo fermentativo foi acompanhada.

4.10.1 Produção de Limoneno-1,2-diol

Na figura 16 observa-se a variação da concentração do limoneno-diol durante 7 dias de fermentação. Nota-se que o limoneno-diol surge no meio fermentativo logo após 24 horas de fermentação, porém em concentração quase nula. O limoneneo-diol tem sua concentração aumentada no meio de forma regular até o quinto dia de fermentação, onde há um salto para o sexto dia, atingindo 2664,85 µg/g. Na tabela 30 podem ser observados os valores exatos da concentração deste derivado do limoneno. No sétimo dia de fermentação é observado um decréscimo da concentração do limoneno-diol. Apesar das diferentes rotas metabólicas existentes para o limoneno, este produto foi o que mais se destacou, indicando a ausências de enzimas por parte do micro-organismo estudado com capacidade para realizar as demais rotas metabólicas.

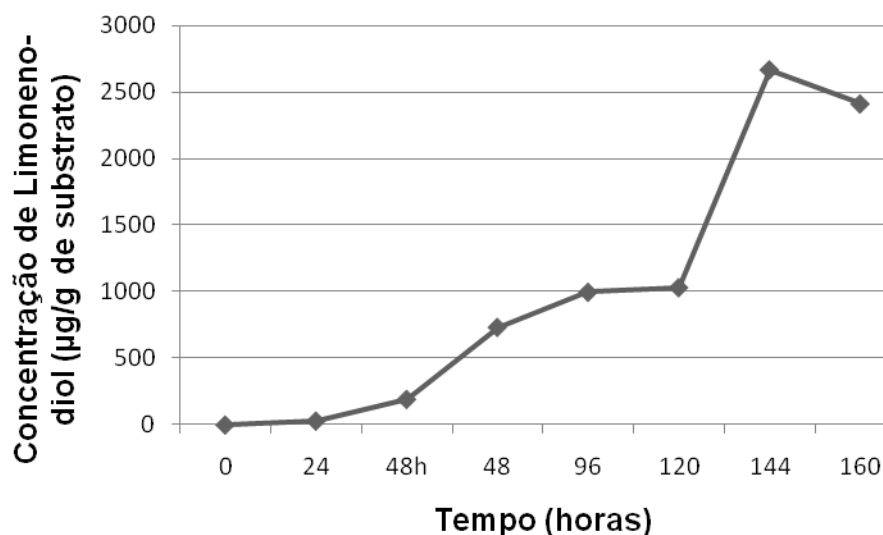


Figura 16: Variação da concentração média de limoneno-diol produzido durante o processo fermentativo.

Tabela 30 – Concentração de limoneno-1,2- diol durante os diferentes dias de fermentação.

Tempo	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
Rendimento	---	0,056	0,375	1,440	1,949	2,017	5,216	4,716
Concentração*	---	29,064	191,60	732,96	995,74	1030,48	2664,85	2409,40

*($\mu\text{g/g}$ de substrato)

4.10.2 Consumo de limoneno

A redução da concentração do limoneno durante o processo fermentativo pode ser observado na figura 17.

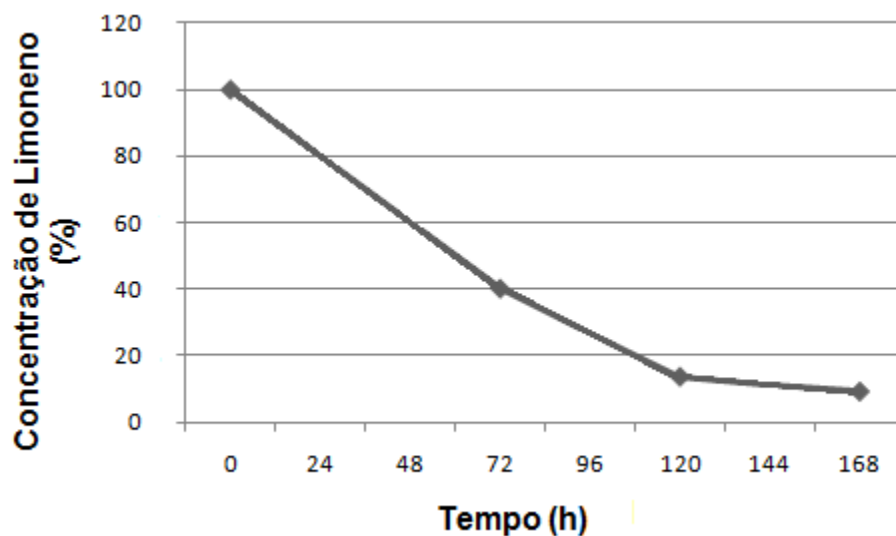


Figura 17: Variação da concentração de limoneno consumido durante o processo fermentativo.

Nota-se que a perda e consumo de limoneno é um processo constante. Como já visto nas fermentações anteriores este limoneno não tem como único destino a biotransformação para limoneno-diol, nem tem como único destino a

biotransformação, podendo ser incorporado a biomassa ou perdido por evaporação.

A redução da concentração de limoneno é elevado no início da fermentação e após 120 horas de fermentação, atingindo valores próximos de 13% do total inicial, esta redução é amenizada. É importante salientar que, dada a elevada concentração inicial de limoneno no meio de cultivo, apenas o consumido entre o quinto e sétimo dias de fermentação (4,48%) já seria suficiente para produção de quase todo o limoneno-diol presente no meio de cultivo.

Outro fato que merece destaque é que apesar da elevada redução do limoneno do meio fermentativo nos primeiros dias de fermentação, a concentração de limoneno-diol atinge seu ápice apenas no sexto dia, com uma diferença elevada em relação ao quinto dia, o que não se pode ver com o limoneno.

Assim, verificou-se que boa parte do teor inicial de limoneno não tem como destino a biotransformação em limoneno-1,2-diol, diferente do que ocorre entre o quinto e sexto dia de fermentação, com um rendimento bastante superior ao visto no início de processo. Considerando que a produção de aromas é fruto do metabolismo secundário, é esperado que estes aromas sejam produzidos após o micro-organismo atingir a fase estacionária de desenvolvimento, sendo que este limoneno consumido durante o início da fermentação provavelmente tenha outro destino.

4.10.3 pH

Na figura 18 observa-se a cinética de pH no processo fermentativo em fermentação em estado sólido. Nota-se que o pH se mantém estável durante a maior parte do tempo, com pequenas variações durante o processo e um leve aumento durante o final. O pH inicial era de 6,15, algo levemente acima do ajustado. Este pH inicialmente decaiu, fixando-se para mais próximo de 6 de 24 horas até 72 horas até que a partir do quinto dia de fermentação passou a subir atingindo o valor de 6,52 ao final da fermentação.

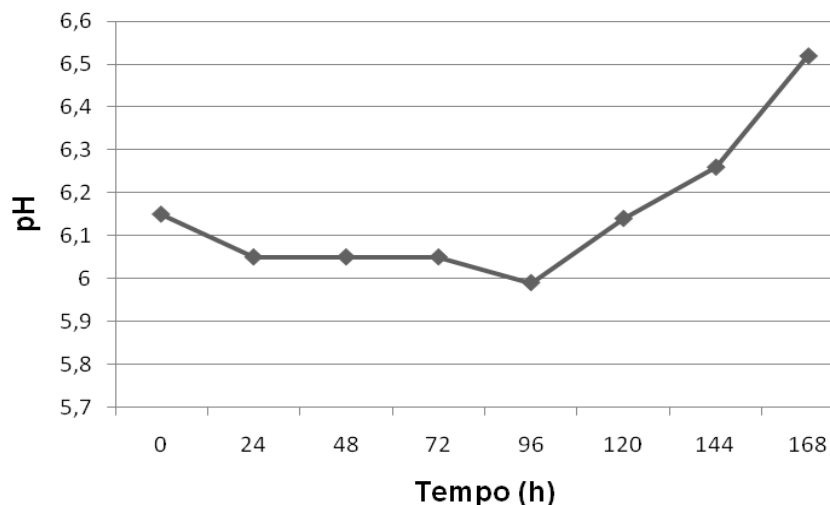


Figura 18: Variação do pH durante o processo fermentativo.

4.10.4 Umidade

A umidade do meio manteve-se quase constante durante a fermentação, como visto na figura 19. Percebe-se como umidade inicial o valor de 80%, um valor pouco abaixo da absorção máxima do substrato. Até o quinto dia do processo fermentativo este valor é praticamente constante, entretanto a partir deste dia o teor de umidade aumenta devido a incorporação da umidade do ar atingindo seu ápice no último dia de fermentação com um valor de 83,19% de umidade.

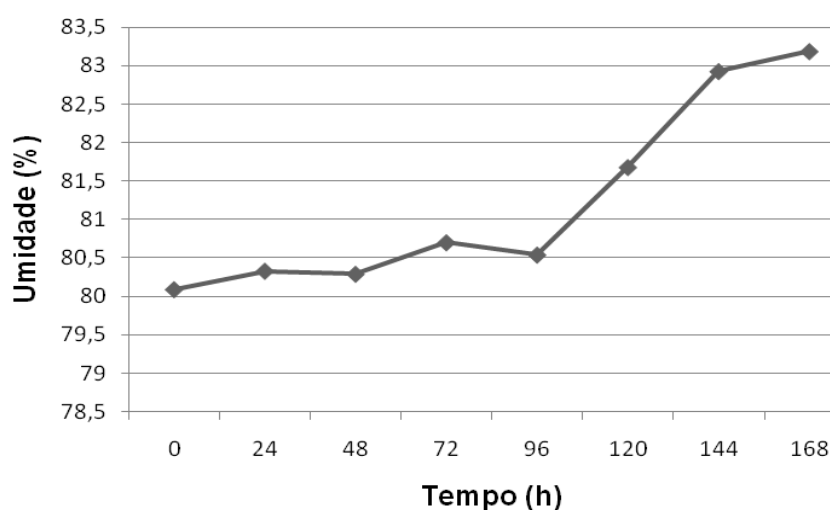


Figura 19: Variação da umidade durante o processo fermentativo.

4.10.5 Açúcar-redutor

No meio fermentativo o açúcar-redutor caiu gradativamente até o último dia de fermentação, quando houve uma queda mais acentuada em relação o dia anterior, atingindo o valor de 67,94 g/L (Figura 20). A princípio observa-se uma queda lenta da concentração de açúcar, algo que não representa bem o início de um processo fermentativo, mas que talvez possa ser explicado pelo fato do micro-organismo já ter sido desenvolvido em um meio para aclimação durante o preparo do inóculo, sugerindo que durante a fermentação já não estaria mais numa fase log de crescimento.

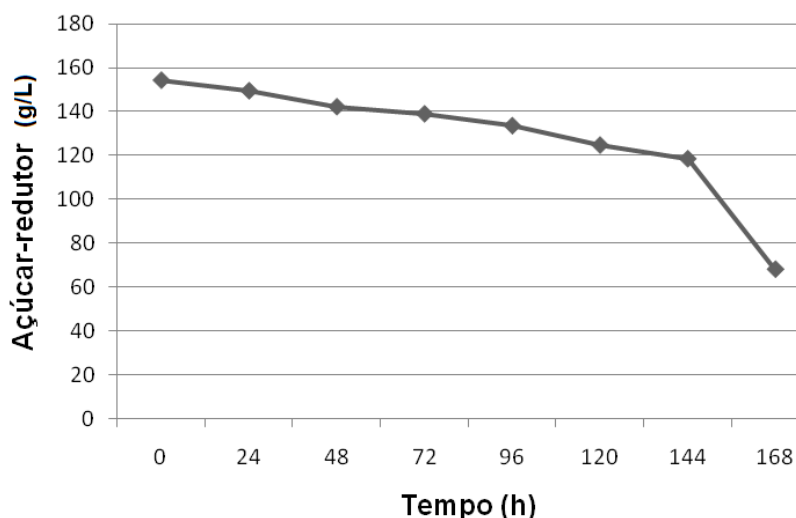


Figura 20: Variação da concentração de açúcares-redutores durante o processo fermentativo.

É importante apontar que o consumo de açúcares não acompanhou a redução de limoneno, que acontece de forma mais rápida no início da fermentação, nem com a produção de limoneno-diol, que aconteceu de forma regular nos primeiros dias e deu um salto do quinto para o sexto dia. Entretanto, há uma boa correlação entre o consumo de açúcares e o pH, pois o aumento do pH foi mais significativo ao final da fermentação, provavelmente devido a produção de compostos nitrogenados.

5 CONCLUSÕES

Quatro substratos diferentes foram analisados quanto a sua composição físico-química e sua composição volátil com a intenção de encontrar um substrato ideal para fermentação em estado sólido. Entre acícula e cepilho de *Pinus*, bagaço de maçã e resíduo de laranja, os dois últimos destacaram-se quanto a concentração de açúcares-redutores e totais (19,75% / 32,84% e 10,13% / 21,13%), porém, o resíduo de laranja se destacou quanto a sua concentração de limoneno (0,055g/g de substrato seco) e por isso foi selecionado para servir como substrato para biotransformação. Um ponto importante refere-se a escassez e inexistência da caracterização do perfil volátil de resíduos.

No presente trabalho 21 cepas foram isoladas e 19 da coleção do Laboratório de Processos Biotecnológicos foram testadas quanto à resistência a terpenos. Para as isoladas, 15 foram resistentes ao limoneno a concentração de 1% e 16 a α e β -pineno (1:1). Quanto às cepas laboratoriais, 11 foram consideradas resistentes ao limoneno a concentração de 1% e 13 a α e β -pineno (1:1).

No teste de fonte de carbono, todas as cepas resistentes isoladas foram testadas, ao passo que as três melhores cepas de *Rhizopus*, no que se refere a altura do micélio, foram testadas. Como resultado do teste de fonte de carbono as cepas isoladas 2b, 2c, 3a, 4a, 4d e Y4b, em adição as cepas da coleção do laboratório *Rhizopus oligosporus* (5), *Pichia stipitis* (16) e *Ceratocystis fimbriata* (19) demonstraram bom potencial e foram utilizadas para a etapa de *screening* de produtos.

Observaram-se nas mais diversas etapas do estudo o sucesso na produção de diferentes compostos derivados de limoneno pelo processo de biotransformação. Na fermentação submersa, apesar de não otimizada, foi possível obter compostos de interesse como o fungo isolado 3a como limoneno-1,2-diol (73,80 μ L/L), carvona (245,10 μ L/L) em concentrações significativas, além de outros compostos em concentrações baixas como álcool perílico através das cepas *Rhizopus oligosporus* e *Pichia stipitis*. Os resultados desta etapa foram

interessantes considerando que seria uma etapa que serviria apenas como *screening*.

Em fermentação em estado sólido com o fungo isolado 3a foi possível utilizar o resíduo da laranja constituído de casca e bagaço para produção de compostos como α -Terpineol e limoneno-1,2-diol, este último em quantidades bastante significativas (3320,46 $\mu\text{g/g}$ de substrato) com relação o que já foi descrito. Acredita-se, entretanto que o maior destaque esteja no fato de não ter sido descrito anteriormente a produção de um derivado de limoneno por biotransformação através de fermentação em estado sólido, que sejam escassos registros deste processo com a utilização de resíduos e que o processo tenha ocorrido sem a adição de quaisquer compostos artificiais, utilizando apenas o meio natural composto do resíduo da laranja e água. Considerando os produtos obtidos, é possível inferir a existência das rotas metabólicas para o limoneno-1,2-diol e α -teripenol no fungo 3a e a existência da rota metabólica para álcool perílico no fungo *Rhizopus oligosporus* e a levedura *Pichia stipitis*, assim como a rota metabólica da carvona, descartando-se a existência das demais rotas metabólicas para biotransformação do limoneno nas cepas estudadas.

Poder-se-ia ainda aperfeiçoar o meio com a adição de nutrientes, algo que não foi contemplado no presente trabalho, assim como realizar a fermentação em estado sólido, utilizando um resíduo agroindustrial como suporte e resíduo do processamento do suco de laranja como substrato para biotransformação. Outra perspectiva seria a otimização dos resultados em fermentação submersa. Porém, considera-se o trabalho foi bem sucedido, uma vez que foi desenvolvido um bioprocessamento desde a seleção do substrato e isolamento da cepa até as etapas intermediárias em estado submerso e por fim a fermentação em estado sólido, algo inexistente até o presente momento no que se trata da biotransformação do limoneno.

6 REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.

ACTION. **Diagrama de Pareto e ANOVA**. Disponível em: <<http://portalaction.com.br/content/sobre-o-action>>. Acesso em: 12/08/2011.

ADAMBOUNOU, T.L. ; CASTAIGNE, F. ; DILLON, J.C. Abaissement de l'activité de l'eau de légumes tropicaux par déshydratation osmotique partielle. **Sciences des Aliments**, Paris: Lavoisier Abonnements. v. 3, n. 4, p. 551-567, 1983.

AL-ALAWI, M. M.; MANDIWANA, K. The use of Aleppo pine needles as a bio-monitor of heavy metals in the atmosphere. **Journal of Hazardous Materials**. v. 148, p. 43-46, 2007

ALEU, J.; COLLADO, I. G.; Biotransformations by *Botrytis* species. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 13, p. 77-93, 2001.

ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Regulamento técnico sobre Aditivos Aromatizantes/ Aromas da Resolução, n. 104, 14 maio 1999.

ARCE, A.; POBUDKOWSKAL, A.; RODRÍGUEZ, O.; SOTO, O. Citrus essential oil terpenless by extraction using 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate ionic liquid: Effect of the temperature. **Chemical Engineering Journal**. v. 133, p. 213-218, 2007.

ASHBELL, G. Conservation of citrus peel by ensiling for ruminant feed. *In*: SIMPÓSIO UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGRO-INDUSTRIAIS E RESÍDUOS DE COLHEITA NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, 1992, São Carlos, SP. *Anais*. São Carlos: EMBRAPA/UEPAE, p.189-190, 1992.

AZAMBUJA, W. **Óleos Essenciais**. org: Pineno. Disponível em: <<http://oleosessenciais.org/tag/alpha-pinene/>>. Acesso em: 17/05/2011.

BADEE, A. Z. M.; HELMY, S. A.; MORSY, N. F. S. Utilisation of orange peel in the production of α -Terpineol by *Penicillium digitatum* (NRRL 1202). **Food Chemistry**. v. 126, p. 849-854, 2011.

BARNOLA, L. F.; CEDEÑO, A.; HASEGAWA, M. Intraindividual Variations of Volatile Terpene Contents in *Pinus caribaea* Needles and its Possible Relationship to *Atta laevigata* Herbivory. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 25, n. 8, p. 707-716, 1997

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2. ed. v.1, Campinas,SP: Editora da Unicamp, 300 p., 2001.

BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, J. **Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses**. 4th ed. Wiley- VCH, Weinheim, 2001.

BERGER, R. G. Biotechnology of flavours—the next generation. **Biotechnol Lett**. 2009.

BICAS, J. L.; DIONÍSIO, A. P.; PASTORE, G. M. Bio-oxidation of Terpenes: An Approach for the Flavor Industry. **Chem. Rev.** v. 109, p. 4518–4531, 2009.

BICAS, J. L.; FONTANILLE, P.; PASTORE, G. M.; LARROCHE, C. Characterization of monoterpene biotransformation in two *Pseudomonads*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 105, p. 1991–2001, 2008.

BICAS, J. L.; PASTORE, G. M. Isolation and Screening of D-Limonene-Resistant *Microorganisms*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 563-567, 2007.

BLACK, J. G. **Microbiologia Fundamentos e Perspectivas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

BRAMORSKI, A. **Caracterização do Crescimento e Produção de Metabólitos Voláteis por Fungos Filamentosos Cultivados Sobre Substratos Agroindustriais**. Dissertação (Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

BROOKER, D. B. ; BAKKER-ARKEMA, F. W.; HALL, C. M. **Drying and storage of grains and oilseeds**. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 450, 1992.

BURDOCK, G. A. **Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients**. 3. ed., CRC: Boca Raton, 1995.

CARVALHO, C. C. R. de.; KEULEN, F. V.; FONSECA, M. M. R., da. Biotransformation of Limonene-1,2-epoxide to Limonene-1,2-diol by *Rhodococcus erythropolis* Cells An Introductory Approach to Selective Hydrolysis and Product Separation. **Food technol. Biotechnol**, v. 38, n.3, p.181 – 185, 2000.

CARVALHO, C. C. R. de.; FONSECA, M. M. R., da. Towards the bio-production of trans-carveol and carvone from limonene: induction after cell growth on limonene and toluene. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 3925-3931, 2003.

CARVALHO, C. C. R. de ; FONSECA, M. M. R., da. (2006), carvone: Why and how one bother to produce this terpene. **Food Chem.**, v. 95, p. 413-422, 2006.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Caloute Gulbenkian, 1994.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**. v. 76, n.3, p. 291–302, 2006.

CHRISTEN, P.; BRAMORSKI, A.; REVAH.; S.; SOCCOL, C. R. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. **Bioresource Technology**. v. 71, p. 211-215, 2000.

CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; CARVALHO, J. L. S.; MONTRUCCHIO, D. P.; FERREIRA, J. L. OLIVEIRA, J. S. Extração de Esteróides em Frutos de *Ottonia martiana* MIQ., Piperaceae, com Gás Liquefeito. **Quim. Nova**. v. 26, n. 6, p.803-806, 2003.

DANIELSKI, L.; BRUNNER, G.; SCHWÄNKE, C.; ZETZL, C.; HENSE, H.; DONOSO, J. P. M. Deterpenation of mandarin (*Citrus reticulata*) peel oils by means of countercurrent multistage extraction and adsorption/desorption with supercritical CO₂. **Journal of Supercritical fluids**. v. 44, p. 215-324, 2008.

DEMYTTENAERE, J.; BELLEGHEM, K. V.; KIMPE, N. Biotransformation of terpenes by fungi Study of the pathways involved. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 11, p. 265–270, 2001.

DEMYTTENAERE, J.; VANORSCHHELDE, J.; KIMPE, N. Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., and the use of solid-phase microextraction for screening. **Journal of Chromatography**, v. 027, p. 137–146, 2004.

DELEST, P. Natural Flavours: Biotech Limited or Unlimited? **Bioilavour** 95, p. 13-19, INRA, Dijon, France, 1995.

DIAZ, S.; ESPINOSA, S.; BRIGNOLE, E. A. Citrus peel oil deterpenation with supercritical fluids optimal process and solvent cycle design. **J. of Supercritical Fluids**. n. 35, p.49-61, 2005.

DIONÍSIO, A; P.; MOLINA, G.; BICAS, J. L.; DIAS, S.; PASTORE, G. M. Fungal biotransformation of terpenes. **New Biotechnology**. v. 25S , set. 2009.

ECHEVERRÍA, G. GRAELL, J.; LARA, I.; LÓPEZ, M. L. Physicochemical measurements in 'Mondial Gala®' apples stored at different atmospheres: Influence on consumer acceptability. **Postharvest Biology and Technology**. v. 50, p. 135–144, 2008.

EMBRAPA. **Cutivo do Pinus**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pinus/CultivodoPinus/index.htm>>. Acesso em: 12/11/2009.

FERON, G.; BONNARME.; DURAND.; Prospects for the microbial production of food flavours. **Trends in Food Science & Technology**. v. 7, p. 285-293, setembro, 1996.

FISCHER, J. S. G.; MOTA e SILVA, M. S.; PASCHOAL, M. E. CARVALHO, P; C.; CARVALHO, M. G. C. Efeito do álcool perílico na expressão gênica de células de adenocarcinoma de pulmão humano. **Bras Pneumol**. v. 31, n. 6, p. 511-515, 2005.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends in Food Science & Technology**. v. 9, n. 3, p.156-164, mar. 2008.

GROHMANN. K. AND BALDWIN, E. A. Hydrolysis of orange peel with pectinase and cellulase enzymes. **Biotechnol Lett**. v. 14, p. 169-174, 1992,

GULLÓN, B.; YÁNEZ, R.; ALONSO, J. L.; PARAIÓ, J. C. L-lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**. v. 99, n. 2, p.309-319, 2008.

HALL, C.W. **Drying and storage of agricultural crops**. Westport: AVI, 1980. 381p.

HANSON, J. R. **An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry**, W.H. Freeman (Ed.), Spektrum, 1995.

Häusler, A. and Munch, T. Microbial production of natural flavours. **ASM-News**, v. 63, p. 551-559, 1997.

HEWLETT-PACKARD DEVELOPMENT COMPANY. **Estatísticas** - Coeficiente de correlação. Disponível em: < <http://h10025.www1.hp.com/ewfrf/wc/Document??=br&lc=pt&dlc=pt&docname=c02171231>>. Acesso em: 10/08/2011.

HWANG, H. M.; WADE, T.; SERICANO, J. L. Concentrations and source characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in pine needles from Korea, Mexico, and United States. **Atmospheric Environment**. v. 37, p. 2259-2267, 2003.

HOLKER U.; LENZ J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 24, p.175-186, 2004.

INCZEDY, J.; LENGYEL, T.; URE, A. M. **Compendium of Analytical Nomenclature**. Definitive Rules 1997, "The Orange Book", 3. ed., Blackwell Science: Oxford, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. e 1.ed. Digital, Seretaria de Estado da Saúde, São Paulo, 2008.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal – 200. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1479&id_pagina=1 >. Acesso em: 10/11/2009.

JANSSENS, L.; DePOOTER, H. L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J. Production of flavours by microorganisms. **Process in Biochemistry**. v. 27, p.195-215, 1992.

KEMPLER, G. M. Production of flavor compounds by microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, 29-51, 1983

KLÁNOVÁ, J.; CUPR, P.; BARÁKOVÁ, D.; SEDA, Z.; ANDĚL, P.; HOLOUBEK, I. Can pine needles indicate trends in the air pollution levels at remote sites? **Environmental Pollution**. v. 157, p. 3248–3254, 2009.

KOFUJITA, H.; ETTYU, K.; OTA, M. Characterization of the major components in bark from five Japanese tree species for chemical utilization. **Wood Sci. Technol.** v. 33, p. 223–228, 1999.

KU, C. S.; SATHISHKUMAR, M.; MUN, S. P.; Binding affinity of proanthocyanidin from waste *Pinus radiata* bark onto proline-rich bovine achilles tendon collagen type I. **Chemosphere**. v. 67, p. 1618–1627, 2007.

KUPCINSKIENE, E.; STIKLIENE, A.; JUDZENTIENE, A. The essential oil qualitative and quantitative composition in the needles of *Pinus sylvestris* L. growing along industrial transects. **Environmental Pollution**. v. 155, p. 481-491, 2008.

LIN, C.; OWEN, S. M.; PEÑUELAS, J. P.; Volatile organic compounds in the roots and rhizosphere of *Pinus* spp. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 39, p.951-960, 2007.

LINDMARK-HENRIKSSON, M. **Biotransformations of turpentine constituents: oxygenation and esterification**, Tese - Mid Sweden University, Stockholm, SWEDEN, 2003.

LONGO, M. A.; SANRÓMAN, M. A. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. **Food Technol. Biotechnol.** v. 44, n. 3, p. 335-353, 2006.

LU, Z. M.; TAO, W.Y.; XU, H.Y.; LIMB, J.; ZHANG; X. M.; WANG; L. P.; CHEN; J. H.; XU, Z. H. Analysis of volatile compounds of *Antrodia camphorata* in submerged culture using headspace solid-phase microextraction. **Food Chemistry**. n. 127, p.

662–668, 2011.

LUDLEY, K. E.; JICKELLS, S. M.; CHAMBERLAIN, P. M.; WHITAKER, J.; ROBINSON, C. H. Distribution of monoterpenes between organic resources in upper soil horizons under monocultures of *Picea abies*, *Picea sitchensis* and *Pinus sylvestris*. **Soil Biology & Biochemistry**, p. 1-10, 2009.

MAHMOOD, A. U.; GREENMAN, J.; SCRAGG, A. H. Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 22, p. 130-137, 1998.

MARINHO, J. L. A. **Proposta de um modelo para avaliação de imóveis urbanos da região do cariri utilizando variáveis sócio-econômicas**. Fortaleza, 2007. Monografia (especialização - Avaliações e Perícias da Engenharia) – Instituto de pós graduação – IPOG.

MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Production of *R*-(+)- α -Terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as médium. **Food Chemistry**. v. 101, n. 1, p. 345-350, 2007a.

MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Jr.; PASTORE, G. M. **Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas**. v. 30, n. 2, 2007b.

MAROSTICA JÚNIOR, M. R. **Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais**. Tese (Ciência de alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, 2006.

MARTINS, I.; MELLO, S. C. M.; ÁVILA, Z.; PÁDUA, R. R.; PEIXOTO, J. R. MELLO, S. C. M. de., ÁVILA, Z.; Pádua, R. R.; PEIXOTO, J. R. Produção de *Colletotrichum gloeosporioides* em meios líquidos. **Circular Técnica** - Embrapa. 45, p. 1-6, 2005.

MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A. P. R.; FREITAS, R. J. S.; CHRISTEN, P.; SOCCOL, C. R.; Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**. v. 6, p. 33-39, 2000.

MEDEIROS, A. B. P. **Produção e Recuperação de aromas obtidos biotecnologicamente**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná – Departamento de Engenharia Química, 2006. 18p. (Banpesq/Thales: 2006020952). Projeto concluído.

MENÉNDEZ, P.; GARCIA, C.; RODRIGUEZ, P; HEINZEN, H. Enzymatic Systems Involved in D-limonene Biooxidation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 45, n. 2, 111-114, 2002.

MIRATA, M. A.; HEERD, D.; SCHRADER, J. Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264. **Process Biochemistry**. v. 44, p. 764–771, 2009.

MUKHERJEE, B. B.; KRAIDMAN, G.; HILL, I. D. Synthesis of Glycols by Microbial Transformation of Some Monocyclic Terpenes. **Applied Microbiology**. v. 25, n. 3, p. 447-453, 1973.

NGADI, M. O.; CORREIA, L. R. Kinetics of solid state ethanol fermentation from apple pomace. **Journal of Food Engineering**. v.17, n. 2, p.97-116, 1992.

NOGUEIRA, A.; SANTOS, L. D.; PAGANINI, C.; WOSIACKI, G.; Avaliação da fermentação alcoólica do extrato de bagaço de maçã. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 187-194, 2005.

OLIVEIRA, J. S. **Avaliação do Emprego de gases liquefeitos no estado subcrítico como solvente para extração de produtos naturais**. Curitiba, 1997. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

ONKEN, J.; BERGER, R. G. Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. **Journal of Biotechnology**. v. 69, p. 163–168, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGRAM, P. **Solid State Fermentation in Biotechnology – Fundamentals and Applications**. Nova Delhi: Asistech Publishers; 2001.

PANDEY A., LARROCHE, C. SOCCOL C.R. DUSSAP C.G. Production of aroma compounds. *In: CURRENT DEVELOPMENTS IN SOLID-STATE FERMENTATION*. India: Springer. **Asiatech Publishers**, Inc, 2008.

PARK, K. J.; BIN, A. ; BROD, F. P. R. Obtenção das Isotermas de sorção e Modelagem Matemática Para a Pêra Bartlett (*Pyrus* sp.) Com e Sem Desidratação Osmótica. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 21, n. 1, 2001.

PEREIRA, C. D. A. **Produção de Metabólitos Frutais por Kluyveromyces Marxianus em Fermentação Submersa em Meio à Base de Melaço de Soja**. Curitiba, 2007. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

PÉRSICO, D. Expectativa da safra da maçã para 2011. Disponível em: <http://www.serrasc.com.br/index.php?option=com_content&view=article&catid=388:noticias&id=1303:expectativa-da-safra-da-maca-para-2011>. Acesso em: 07/04/2011.

PINHEIRO, T. L. F. **Produção de Lípases por Fermentação em Estado Sólido e Submersa Utilizando *Penicillium Verrucosum* como micro-organismo.** Erechim-RS, 2006. 106 p. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos) – Universidade regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI.- Campi de Erechim.

RAIMBAULT M. General and microbial aspects of solid state fermentation. In: International training Course on Solid State Fermentation, **FMS**, v. 97, 6-10 Outubro, Curitiba, Brasil, Documento ORSTOM, Montpellier, França, 1997.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica.** 92 p. Dissertação (Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ROSSI, S. C.; VANDERBERGHE, L. P. S.; PEREIRA, B. M. P.; GAGO, F. D.; RIZZOLO, J. A.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. **Food Research International**. v. 42, p. 484-486, 2009.

ROSSI, S. C. **Produção de Aromas Frutais Por *Ceratocystis fimbriata* Cultivado em Polpa Cítrica, Farelo de Soja e Melaço de Cana Por Fermentação no Estado Sólido – Determinação da Atividade de Poligalacturase, Esterases e Lipase.** Curitiba, 2011. 89 p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico.** Rio de Janeiro: Eventos, 2002.

SANTOS, A. C. A.; SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. **Estudos de processos de extração de óleos essenciais e bioflavonóides de frutas cítricas.** Caxias do Sul-RS: Educs, 2003.

SCHARPF, I. G.; SEITZ, E. W.; MORRIS, A. J.; FARBOOD, M. I. Generation of Flavor and Odor Compounds through Fermentation Processes. In: PARLIAMENT, T. H.; CROTEAU, R. (ED). Biogenesis of aromas. **American Chemical Society**, p.323-346, 1986. (Symposium Series, 317).

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Engenharia Química. In: BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher; 2001.

SCHRADER, J.; BERGER, R. G. Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds. In: REHM, H.-J., REED, G. (2nd Ed), **Biotechnology**. Weinheim: Wiley-VHC, p. 373-422, 2001

SCHEWE, H.; PSECHECK, M.; SELL, D.; SHCRADER, J. Biotechnological production of terpenoid flavour and fragrance compounds in tailored bioprocesses. **Flavour Science: Recent Advances and Trends**. p. 45 – 48, 2006.

SEMIZ, G.; HEIJARI, J.; ISIKI, K.; HOLOPAINEN, J. K. Variation in needle terpenoids among *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae) provenances from Turkey. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 35, p.652-661, 2007.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNA, E. Biocatalytic preparation of naturaflavours and fragrances. **TRENDS in Biotechnology**. v. 23, n.4, p. 193-198, 2005

SHASHIREKHA, M. N.; BASKARAN, R.; JAGANMOHAN, L. Influence of processing conditions on flavour compounds of custard apple (*Annona squamosa* L.) LWT - **Food Science and Technology**. v. 41, n. 2, p. 236-243, 2008.

SHOJAOSADATI, S.A. BABAEIPOUR, V. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. **Process Biochemistry**. v. 37, n.8, p.909-914, 2002.

SILVA, L. V. ; CONSTÂNCIO, S. M.; MENDES, M. F.; COELHO, G. L. V. Extração de Óleo Essencial da Pimenta Rosa (*Schinus molle*) usando Hidrodestilação e Soxhlet. In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2005, Campinas,SP. Livro de Resumos do COBEC-IC, 2005. v. 1. p. 1-2.

SILVA A.R.Z.; FERRER P.P.; SOCCOL, C.R.; GERN, J. C.: PRODUÇÃO DE FITASE POR ASPERGILLUS NIGER EM FERMENTAÇÃO SÓLIDA UTILIZANDO RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA NACIONAL; SINA Ferm 2003. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis-SC. Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t338.doc>. Acesso em: 15 fev. 2008.

SOARES, M. **Metabólitos Frutais Produzidos por Pachysolen Tannophylus e Ceratocystis fimbriata em Fermentação no Estado Sólido Sobre Casca de café**. 91 p. Dissertação (Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

SOCCOL, C.; VANDENBERGHE, L. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, n. 2-3, p. 205–218, 2003.

SOUZA, L. **TV Sebrae: Móveis sem desperdício**. Disponível em: <<http://tv.sebrae.com.br/home/sebraenacional/tag/721/166.49/layout>>, Acesso em: 20/11/2009.

STEINBRECHER, R.; HAUFF, K.; RIISSLER, J.; DIIRR, M.; SEUFERT. Monoterpene Emission from Valencian *Citrus* Belt, Spain Soils in Orange Plantations of the Spain. **Phys. Chem. Earth B**. v. 24, n. 6, p. 695-698, 1999.

STRAPASSON, R. A. **Biotransformação do limoneno e do isoesteviol pelo fusarium verticilloides**. Curitiba, 1996. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

TAN, Q.; DAY, D. F.; CADWALLADER, K. R. Bioconversion of (R)-(+)-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). **Process Biochemistry**. v. 33, n. 1, p. 29-31, 1998.

THE GOOD SCENT COMPANY. Limonene-glycol. Disponível em: <<http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1289451.html>>. Acesso em: 22/07/2011.

TING, S. V.; ROUSEFF, R. L.; Dietary fiber from citrus wastes: Characterisation. **ACS Symp.** Ser. 214, p. 205-219, 1983.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L. ; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: 2005, Artmed.

VAN DYK, M. S.; VAN RENSBURG, E. V.; RENSBURG, L. P. B.; MOLEKI, N. Biotransformation of monoterpenoid ketones by yeasts and yeast-like fungi. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 5, p 149–154, 1998.

VAN DER WERF, M. J.. SWARTS, H. J.; DE BONT, J. A. Rhodococcus erythropolis DCL14 Contains a novel degradation pathway for limonene. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, n. 5, p. 2092-2102, 1999.

VANEK T.; VALTEROVA I.; VANKOVA R.; VAISAR, T.; Biotransformation of (-)-limonene using Solanum aviculare and Dioscorea deltoidea immobilized plant cells. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 625-628, 1999.

VARIAN. **Nist 98 MS Library Database**, ver. 1.7. USA, 1998.

VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. **Quím. Nova**. v. 30, n. 8, 2007.

VILLATORO, C.; ALTISENT, R.; ECHEVERRÍA, G.; GRAELL, J.; LÓPEZ, M. L.; LARA, I. Changes in biosynthesis of aroma volatile compounds during on-tree maturation of 'Pink Lady®' apples. **Postharvest Biology and Technology**. v. 47 p. 286–295, 2008.

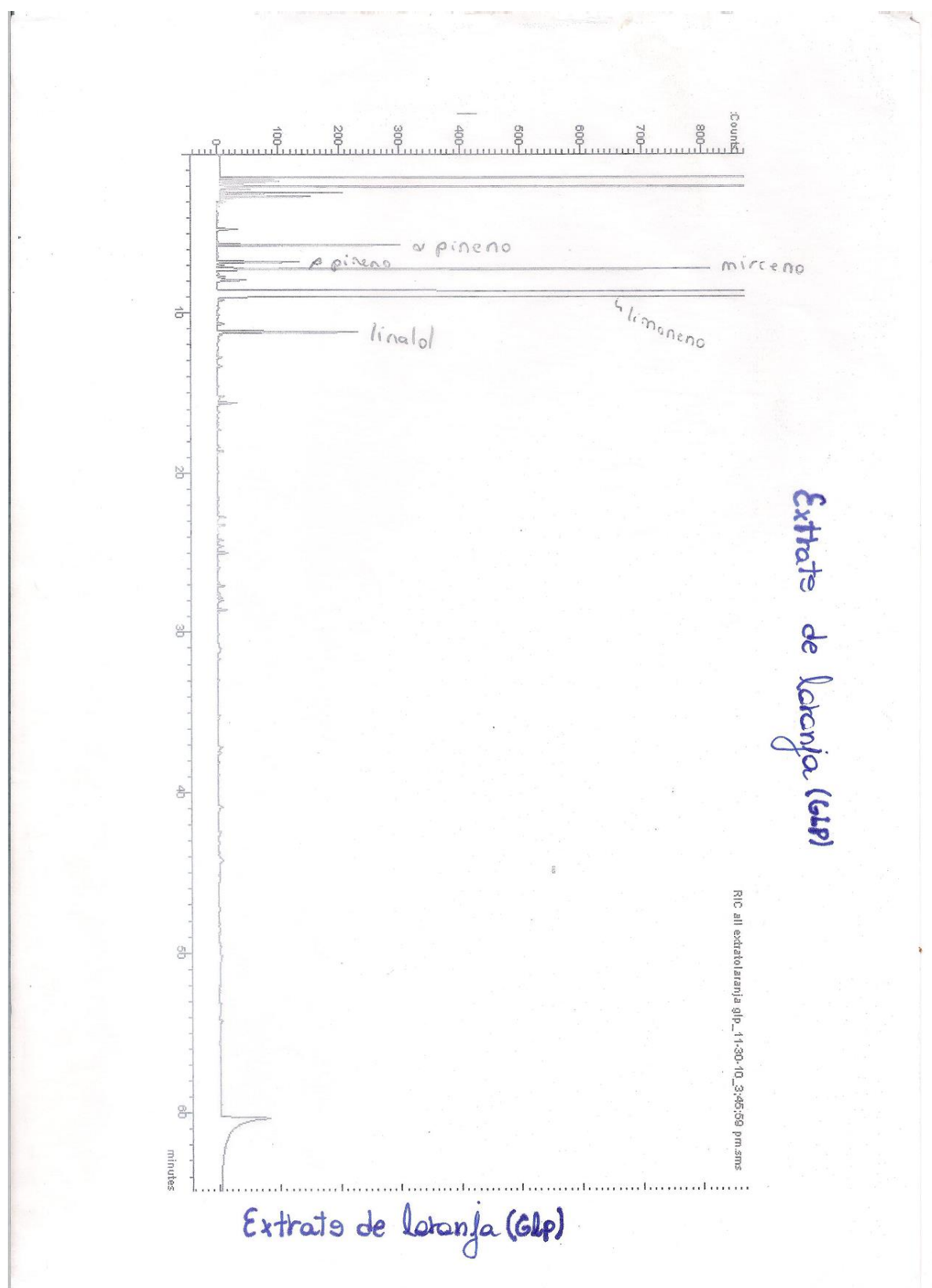
WALTON, N. J.; MAYER, M. J.; NARBAD, A. Vanillin. **Phytochemistry**. v. 63, p. 505–515, 2003.

YADAVA, A. R.; CHAUHAN, A. S.; REKHA, M. N.; RAMTEKE, R. S. Flavour quality of dehydrated lime [Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle]. **Food Chemistry**. v. 85, p. 59-62, 2004.

YOO, S.K.; DAY, D. F. Bacterial metabolism of α -pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. Strain PIN. **Process Biotechnol.** v. 37, p. 739-745, 2002.

ZHENG, Z. ; SHETTY, K. Enhancement of pea (*Pisum sativum*) seedling vigour and associated phenolic content by extracts of apple pomace fermented with *Trichoderma* spp. **Process Biochemistry.** v.36, n.1, p.79-84, 2000.

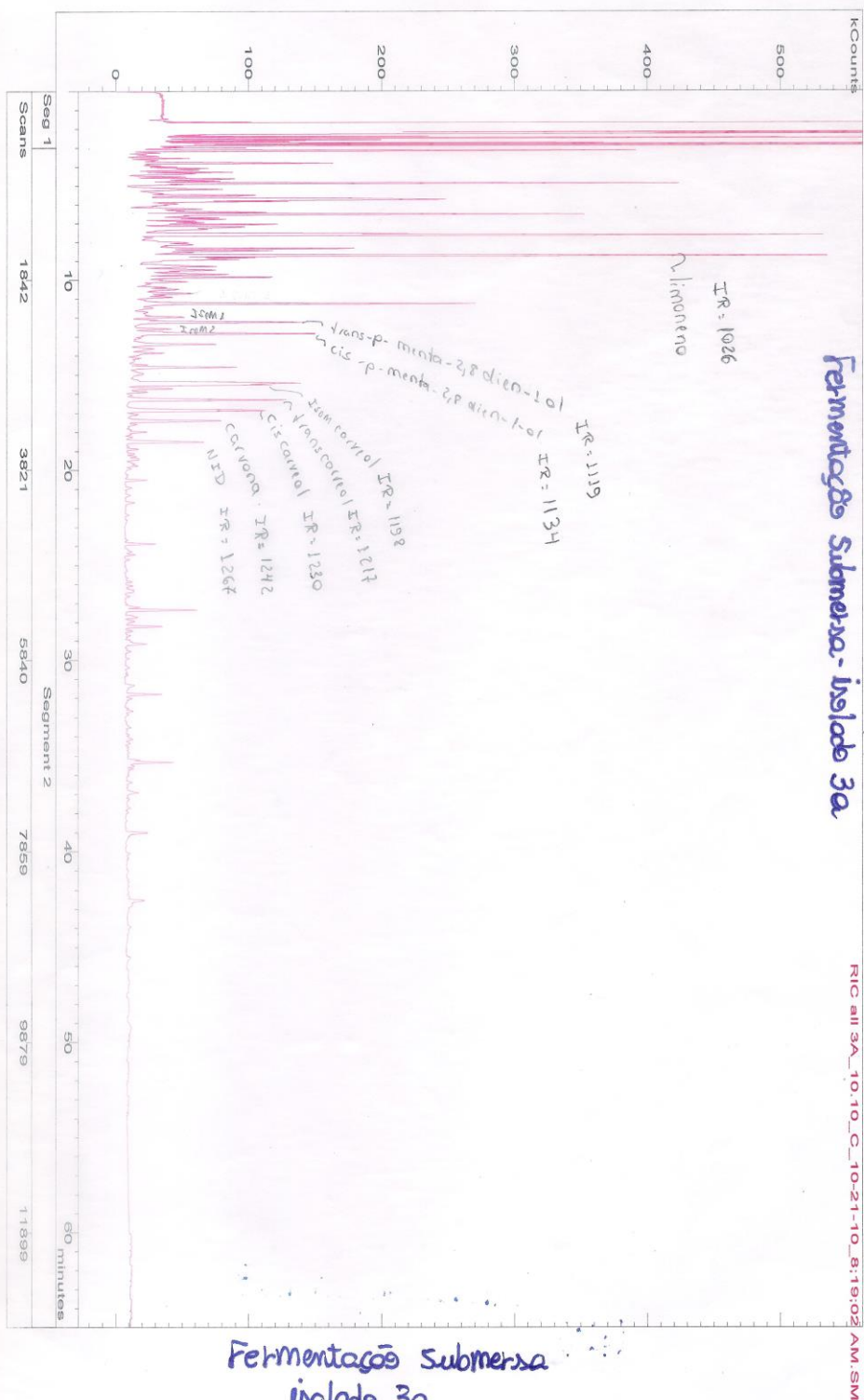
ANEXOS



Chromatogram Plot

File: c:\...idskriptodriane_mario\ja3a_10_10_c_10-21-10_8;19;02 am.sms
Sample: 3A_10_10_C
Scan Range: 1 - 12905 Time Range: 0.00 - 64.99 min.
Opera
Date: 2

Operator: Lilian
Date: 21/10/2010 09:19

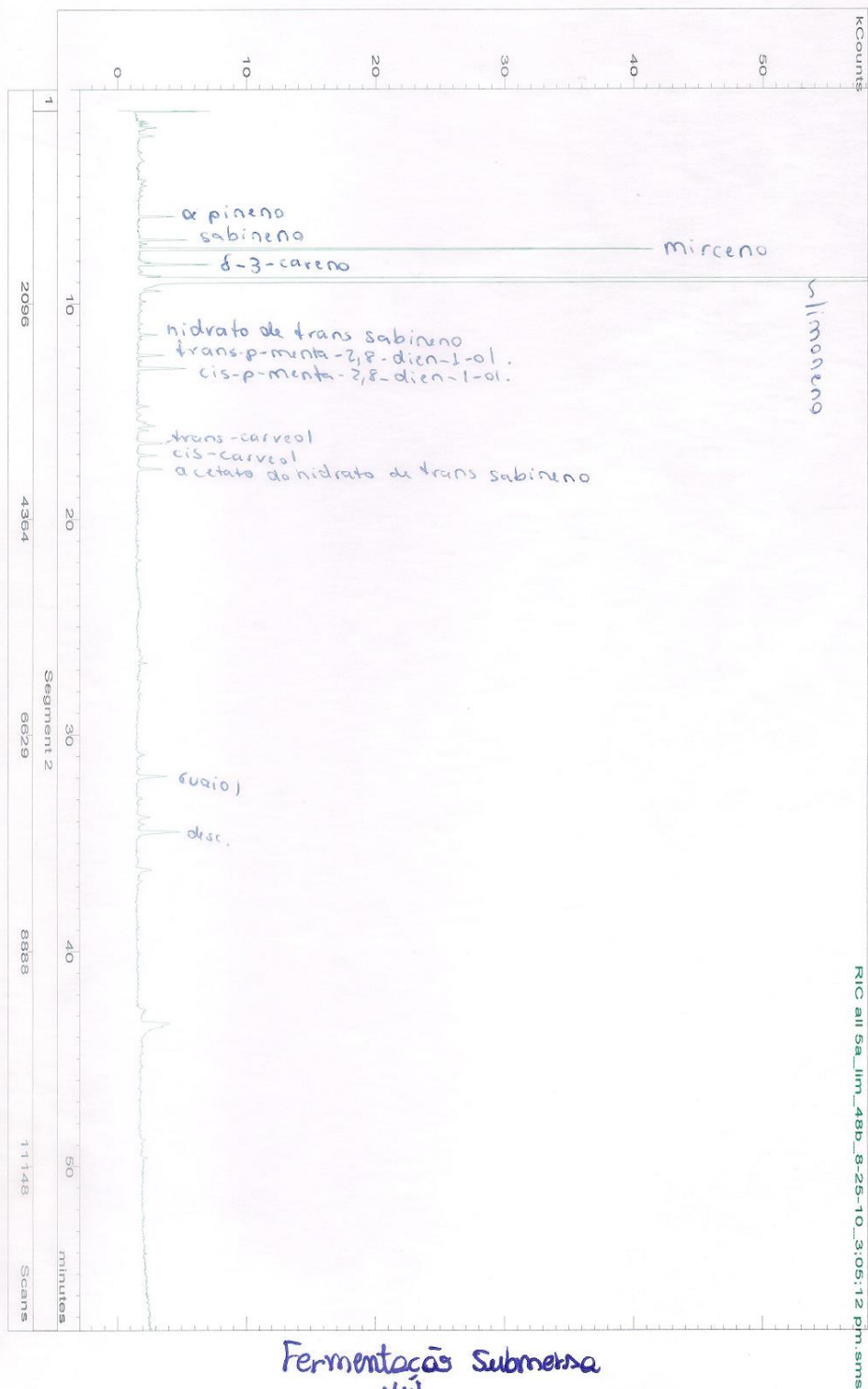


Fermentação Submersa
Inclado 3a

Print Date: 09 Nov 2010 16:13:03

Chromatogram Plot

File: c:\... \lilian\desktop\adriane_mario\5a_lim_48b_8-25-10_3:05:12 pm.sms = **Y4b**
 Sample: 5A_lim_48B
 Scan Range: 1 - 12864 Time Range: 0.00 - 57.62 min.
 Operator: Lilian
 Date: 25/08/2010 15:05



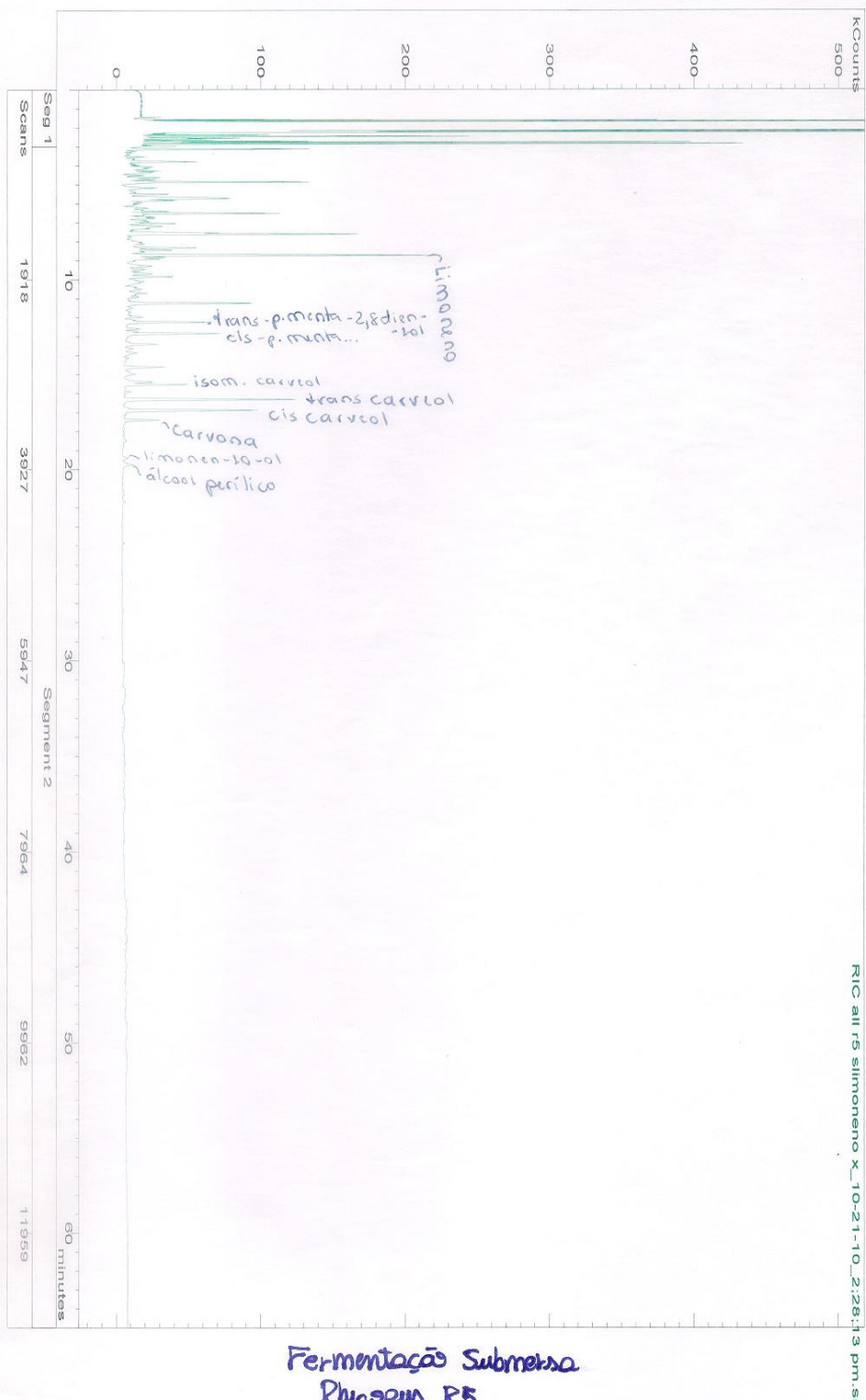
Fermentação Submersa
Y4b

Print Date: 09 Nov 2010 15:57:10

Chromatogram Plot

File: c:\... \adriane_mario\jv5 slimoneno x_10-21-10_2:28:13 pm.sms
 Sample: r5 slimoneno x
 Scan Range: 1 - 12955 Time Range: 0.00 - 64.99 min.

Operator: Lilian
 Date: 21/10/2010 15:28



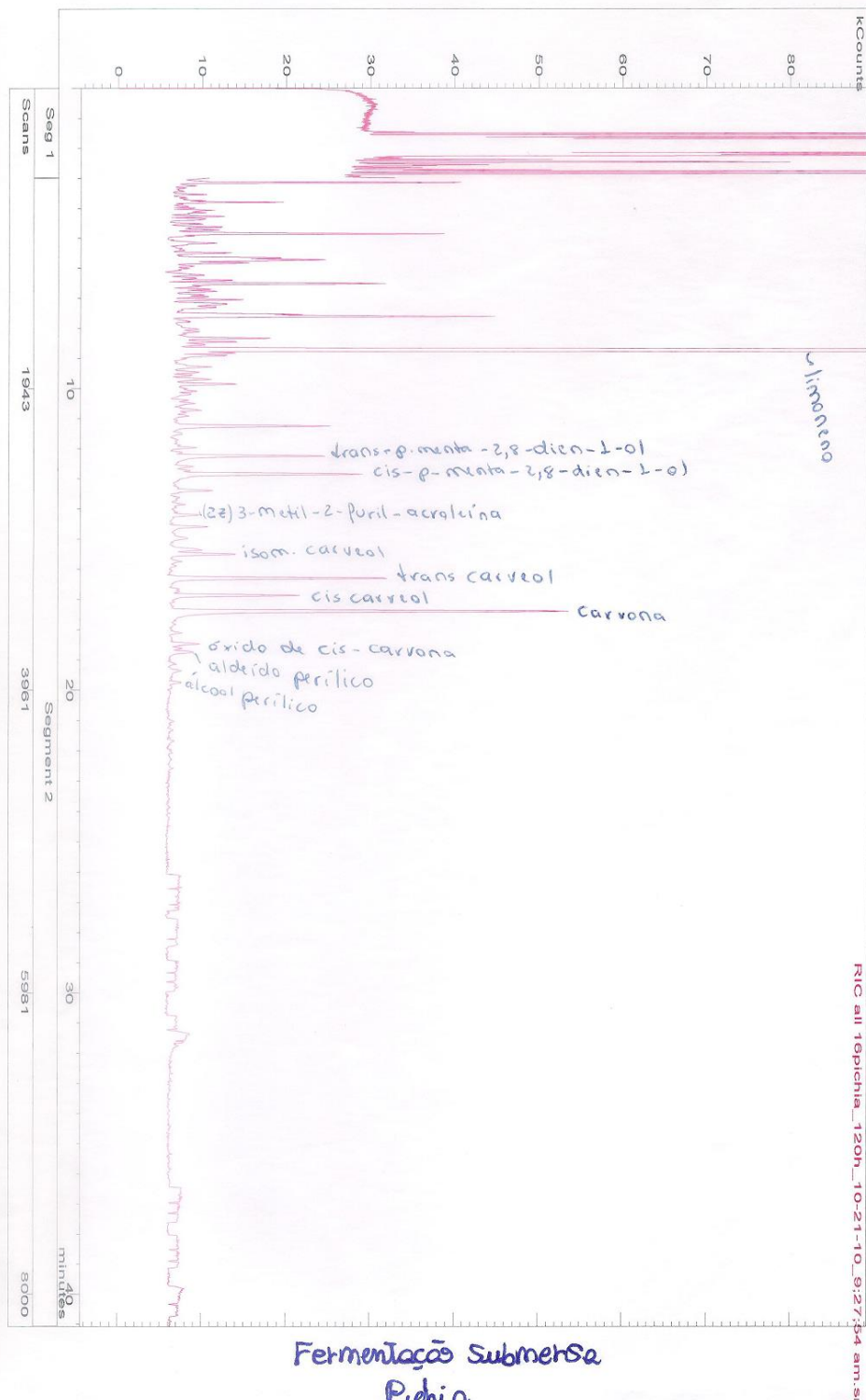
Fermentação Submersa
Rhizopus R5

Print Date: 09 Nov 2010 15:49:20

Chromatogram Plot

File: c:\... \desktop\adriane_mario\16picchia_120h_10-21-10_9:27:54 am.sms
 Sample: 16picchia_120h
 Scan Range: 1 - 8215 Time Range: 0.00 - 41.07 min.

Operator: Lilian
 Date: 21/10/2010 10:27



Fermentação Submersa
Pichia

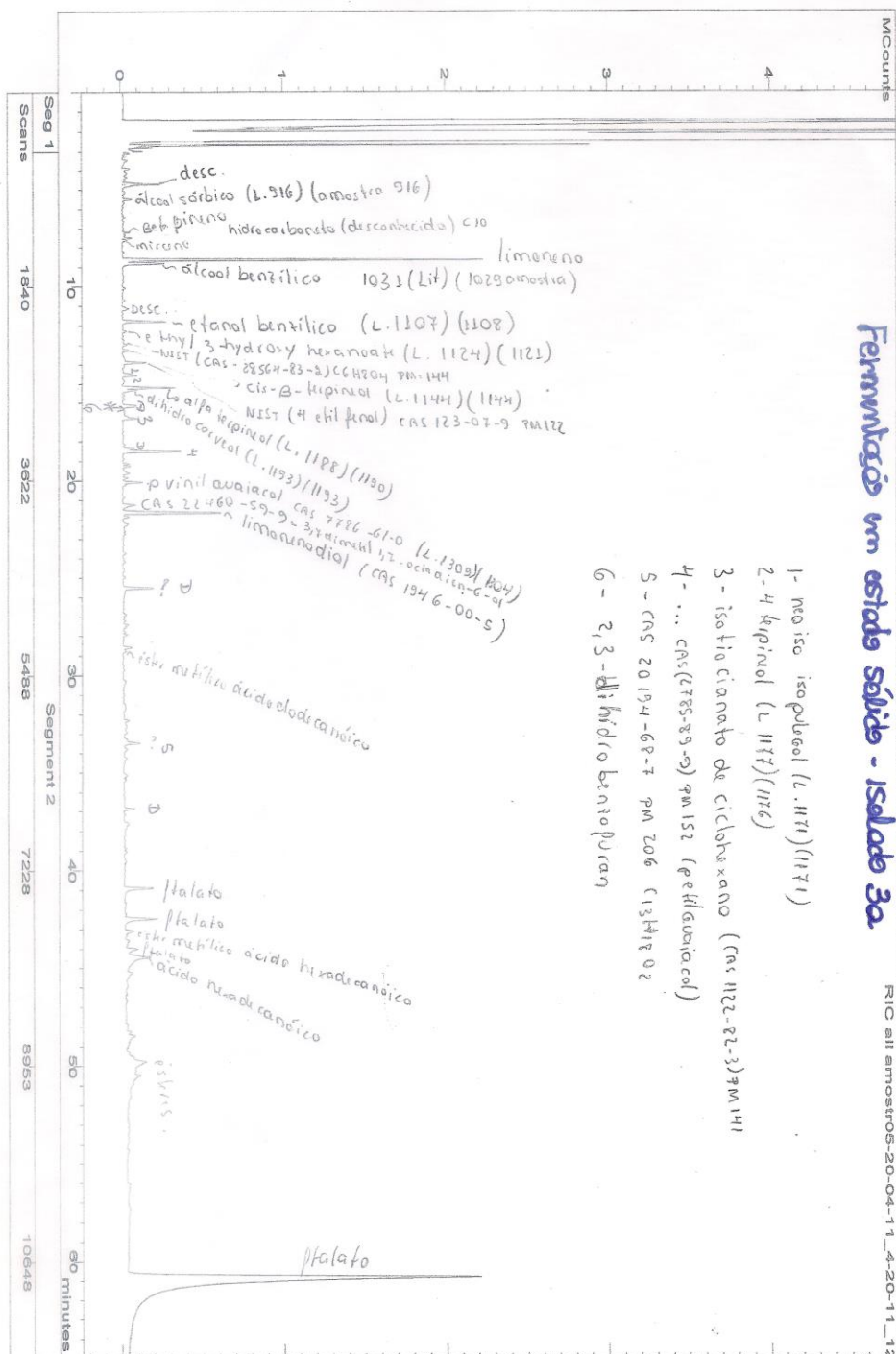
Chromatogram Plot

File: c:\... \adriano_marilva\mostro5-20-04-1_4-20-1_12:49:41 pm.sms
Sample: mostro5-20-04-11
Scan Range: 1 - 11507 Time Range: 0.00 - 64.99 min.
Da

Operator: Lilian
Date: 20/04/2011 12:49

Fermentação em estado sólido - 1 Salado 3a

RIC allstpos(05-20-04-11_4-20-11_12:49:41)



Fermentação em estado sólido
1/colado 3a